



Etude théorique et expérimentale de la translocation de macromolécules à travers un nanopore

Fabien Piguet

► To cite this version:

Fabien Piguet. Etude théorique et expérimentale de la translocation de macromolécules à travers un nanopore. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Cergy Pontoise, 2014. Français. NNT : 2014CERG0728 . tel-01165325

HAL Id: tel-01165325

<https://theses.hal.science/tel-01165325>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Cergy-Pontoise
École doctorale Science et Ingénierie

Thèse

présentée par

Fabien PIGUET

pour l'obtention du grade de docteur
spécialité : physique

Étude théorique et expérimentale du transport de macromolécules à travers un nanopore

Soutenue le 22 septembre 2014 devant le jury composé de :

M. AUVRAY Loïc	Président
M. WINTERHALTER Mathias	Rapporteur
M. FYTAS Nikolaos	Rapporteur
M. CARLON Enrico	Examineur
M. PELTA Juan	Examineur
M. FOSTER Damien	Directeur de thèse
M. OUKHALED Abdelghani	Co-directeur de thèse

Table des matières

Introduction	6
1 Revue de la méthode expérimentale	11
1.1 Principe de la détection	11
1.2 Nanopores	17
Nanopore d' α -hémolysine	19
1.3 Acquisition des données	23
2 Revue du processus de translocation	27
2.1 Grands régimes et petits modèles	29
2.1.1 Capture d'une macromolécule par un nanopore	29
2.1.2 Dynamique d'une macromolécule dans un nanopore	34
2.2 Autres modèles	41
2.2.1 Modèle de Fokker-Planck	41
2.2.2 Simulations	44
2.3 Effets en jeu	47
2.3.1 Voltage	47
2.3.2 Interaction molécule/pore	51
2.3.3 Longueur et conformation de la molécule	52

2.3.4	Autres	57
3	L'électroosmose à travers le nanopore d'α-hémolysine dépend du type de cation alcalin en solution	59
4	Translocation de polymères courts et longs à travers un pore interactif	87
5	Effets collaboratifs dans la translocation de polymères et apparition de barrières d'énergie fictives	102
	Annexe	113
	Conclusion et perspectives	117
	Bibliographie	120

Remerciements

Je remercie d’abord Damien Foster d’avoir accepté d’encadrer cette thèse. Damien, merci pour ton aide, en particulier dans les travaux de simulation, et pour ton soutien durant ces trois ans. Je te souhaite le meilleur ainsi qu’à ta famille dans votre aventure à Coventry, où vous n’avez pas “été envoyés” mais où vous êtes partis de vous-même...

Je remercie également Abdelghani Oukhaled d’avoir co-encadré cette thèse. Ghani, merci de m’avoir formé aux expériences sur les nanopores ainsi que pour ton investissement, ton soutien et ta générosité.

Merci à Juan Pelta d’avoir contribué à l’initiation de cette thèse.

Merci à l’école doctorale Sciences & Ingénierie de l’Université de Cergy-Pontoise d’avoir financé cette thèse.

Merci à l’ensemble du jury, et en particulier aux rapporteurs Mathias Winterhalter et Nikolaos Fytas, d’avoir accepté d’examiner cette thèse.

Merci aux membres du LPTM et du LAMBE qui m’ont accueilli.

Au LPTM merci à Claire Pinettes et Guy Trambly, pour leur écoute, leur aide et leur investissement dans l’enseignement.

Merci à Sylvie Villemin, figure maternelle du labo, indispensable à son bon fonctionnement, à la bonne humeur contagieuse et aux délicieux gâteaux!

Merci à Cédric Gérard, pour son amitié, sa recette du guacamole et nos

parties de tennis. Je quitte le labo sur 100% de victoires (un set ne suffit pas...)

Merci à Marion Moliner, post-doc au début de ma thèse.

Merci et bon courage à Aurélien Bailly-Reyre, Valentin Bois et Sahbi El Hog, autres thésards du labo. Valentin, achète un téléphone et appelle-moi quand ce que tu étudies existera réellement et que tes nombres seront des nombres. Aurélien, prends bien soin de Valentin.

Au LAMBE merci à Françoise Discala et Marie-France Breton, relayeuses de l'équipe des manips, et à Noémie Ein-Eli pour les discussions autour de la paillasse, parfois avec un pore, parfois sans...

Enfin merci à Emily, à ma famille et ma belle-famille, pour leur soutien et leur amour.

Introduction

Dans les systèmes biologiques, les ions et les macromolécules traversent les membranes de lipides en circulant dans des canaux protéiques nanométriques [1]. Ce phénomène, la translocation, est d'une grande importance. On peut citer le transport d'ions [2] et d'ARN [3] entre le noyau et le cytoplasme des cellules à travers les pores nucléaires, le transport des protéines vers les différents compartiments cellulaires [4, 5, 6] ou encore l'injection d'un ADN viral à travers la membrane cellulaire [7, 8]. Les pores peuvent être plus ou moins sélectifs aux espèces qui les traversent, aider les molécules à traverser (pores actifs) ou non (pores passifs).

Une connaissance détaillée du processus de transport nécessite la détection à l'échelle nanométrique du passage d'une molécule à travers le pore. Dès les années 1970 il a été possible de mesurer le courant d'ions circulant sous l'effet d'un champ électrique à travers des pores protéiques insérés dans des membranes lipidiques reconstituées [9] ou dans des membranes biologiques intactes (technique du *patch-clamp* [10]). Cependant ce n'est qu'en 1996 que Kasianowicz et son équipe [11] ont pu observer directement le passage de molécules individuelles dans un pore unique; il s'agissait d'ARN et d'ADN simple brin transporté à travers le pore formé par la toxine α -

hémolysine de *Staphylococcus aureus* insérée dans une membrane lipidique reconstituée. Le principe de la détection expérimentale à l'échelle moléculaire est le même que celui du compteur Coulter [12] développé dans les années 1950 à l'échelle micrométrique pour compter des particules en solution et estimer leur taille. L'application d'un champ électrique constant à travers un pore inséré dans une membrane séparant deux compartiments remplis d'une solution ionique provoque un courant électrique constant mesurable. Le passage d'une particule dans le pore provoque un bouchage temporaire du courant, qui peut être détecté. À l'échelle moléculaire, les voltages appliqués sont typiquement de l'ordre de la centaines de millivolts, générant des courants de l'ordre de la centaine de picoampères. Avec les moyens actuels, le passage d'une molécule dans un pore nanométrique peut être détecté si la durée du bouchage provoqué dépasse quelques microsecondes. La profondeur, la fréquence et la durée des bouchages dépend d'un grand nombre de paramètres expérimentaux, tels que la nature de la molécule et du pore, la longueur et la conformation de la molécule, le voltage appliqué, ou encore la nature et la concentration des espèces en solution.

L'application la plus naturelle du transport de molécules à travers un pore est l'utilisation d'un pore de diamètre connu pour filtrer les molécules en solution en fonction de leur taille [13]. Le procédé inverse a également été utilisé pour sonder les dimensions internes de pores protéiques, en y faisant pénétrer des molécules de taille connue de plus en plus grosses jusqu'à ne plus y parvenir [14, 15, 16, 17]. Par ailleurs le contrôle de la translocation à l'échelle moléculaire peut permettre d'utiliser les nanopores comme détecteurs des caractéristiques des molécules transportées. Une des applications les plus prometteuses vient de la possibilité de relier les propriétés

du bouchage de courant observé avec la structure sub-moléculaire de la molécule transportée. Ceci ouvre la voie à une technique de séquençage rapide et peu coûteuse de l'ADN [11, 18, 19, 20]. On peut aussi citer l'utilisation des nanopores comme capteurs du dépliement, transport et repliement de protéines [21, 22, 23, 24, 25], processus dont le dysfonctionnement est associé à de nombreuses pathologies [26, 27, 6].

Depuis les expériences historiques, de nombreux travaux expérimentaux et théoriques ont été menés pour comprendre le processus de translocation. L'interprétation des données expérimentales est utilisée pour déterminer les différents mécanismes en jeu durant le processus, et les paramètres ayant une influence. Ceci peut permettre non seulement de comprendre la translocation dans les systèmes biologiques, mais aussi d'utiliser la translocation de façon contrôlée dans des systèmes construits pour des usages spécifiques. Cependant à l'heure actuelle de nombreuses questions restent posées sur les mécanismes de la translocation et l'origine de certaines observations expérimentales. Dans cette thèse nous avons réalisé des expériences et des simulations informatiques pour étudier quelques-uns des principaux effets pouvant être impliqués dans la translocation et interpréter ou ré-interpréter certaines observations expérimentales. Cette thèse a été menée à l'Université de Cergy-Pontoise sous la direction de Damien Foster du Laboratoire de Physique Théorique et Modélisation, en collaboration avec Abdelghani Oukhaled du Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement. Le financement provient d'une bourse d'allocation de recherche de l'Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie de l'Université de Cergy-Pontoise.

Le premier chapitre décrit la méthode expérimentale de détection du

transport de molécules individuelles à travers un pore nanométrique unique, son principe et les grandes étapes historiques ayant conduit aux méthodes actuelles. Un paragraphe est dédié aux différents nanopores existants, avec une attention particulière pour l' α -hémolysine, l'un des pores protéiques les plus communément utilisés et que nous avons étudié. Enfin la méthode d'acquisition et d'analyse des données expérimentales est présentée.

Le second chapitre présente l'état de l'art sur la description du processus de translocation. Les grands régimes caractérisant le processus d'entrée d'une molécule dans un pore et la dynamique de transport de la molécule dans le pore sont présentés, avec pour chacun d'eux un petit modèle théorique reliant le comportement des grandeurs observables aux paramètres de l'expérience. D'autres façons de modéliser le processus de translocation sont ensuite décrites, à commencer par le modèle analytique de Fokker-Planck suivi des méthodes de simulation informatique les plus fréquemment utilisées. La dernière partie du chapitre est consacrée aux principaux paramètres expérimentaux et à leur effet sur le processus de translocation.

Le chapitre 3 présente nos résultats expérimentaux sur l'existence d'un écoulement électroosmotique dans le nanopore d' α -hémolysine. Nous avons montré qu'un tel écoulement existe et qu'il conditionne la fréquence d'entrée et le temps de résidence de molécules électriquement neutres (beta-cyclodextrines) dans le pore dans une large gamme de voltage appliqué et de concentration en sel. En particulier nous avons observé que la force de l'écoulement électroosmotique dépend du type de cations en solution : l'écoulement est plus fort en présence de LiCl que de KCl. Ce travail est décrit dans un article [28] soumis à *ACS Nano*.

Le chapitre 4 présente le résultat de nos simulations informatiques du transport d'un polymère à travers un pore interagissant avec le polymère. Nous avons montré que la position de l'interaction dans le pore influence la fréquence d'entrée et le temps de résidence du polymère dans le pore. En revanche quelle que soit la position de l'interaction le temps de résidence augmente linéairement avec la longueur du polymère lorsque le polymère est plus long que le pore, en accord avec des observations expérimentales publiées [29, 30]. L'analyse du processus de translocation nous permet de dégager l'origine de ce comportement. Ce travail est décrit dans un article [31] publié dans *The Journal of Chemical Physics* en 2013.

Le chapitre 5 présente un nouveau modèle de simulation de la translocation d'un polymère. Ce modèle nous permet d'étudier spécifiquement l'effet des mouvements collaboratifs des monomères à l'intérieur du pore. Nous avons montré que cet effet de collaboration peut générer un comportement du temps de translocation avec la longueur du polymère qualitativement similaire à ce qui est habituellement interprété comme l'existence d'une barrière d'énergie libre, alors même qu'une telle barrière n'existe pas dans le modèle. De plus ce nouveau modèle requiert un temps de simulation bien inférieur aux dynamiques moléculaires traditionnelles. Ce travail est décrit dans un article [32] publié comme "Rapid Communication" dans *Physical Review E* en 2014. Une annexe est ensuite consacrée à des résultats non publiés concernant l'effet d'une différence de potentiel chimique entre les deux compartiments séparés par le pore.

Chapitre 1

Revue de la méthode expérimentale

1.1 Principe de la détection

Au début des années 1950, Coulter a mis au point un système permettant de compter des particules dispersées en solution [12]. Le principe du compteur Coulter est la base des techniques actuelles de détection électrique du passage de particules à travers un pore à l'échelle unique. Ce principe, illustré sur la figure 1.1, est le suivant : une paroi percée d'un pore sépare deux compartiments remplis d'une solution contenant des ions et les particules à compter. L'application d'une force (de pression ou électrique) provoque un écoulement à travers le pore. Le flux d'ions à travers le pore génère un courant électrique, mesuré par deux électrodes placées de part et d'autre du pore. Lorsque le pore est totalement libre au passage des ions, le courant mesuré est maximal. Le passage d'une particule dans le pore bloque partiellement le passage des ions, provoquant une chute temporaire du courant

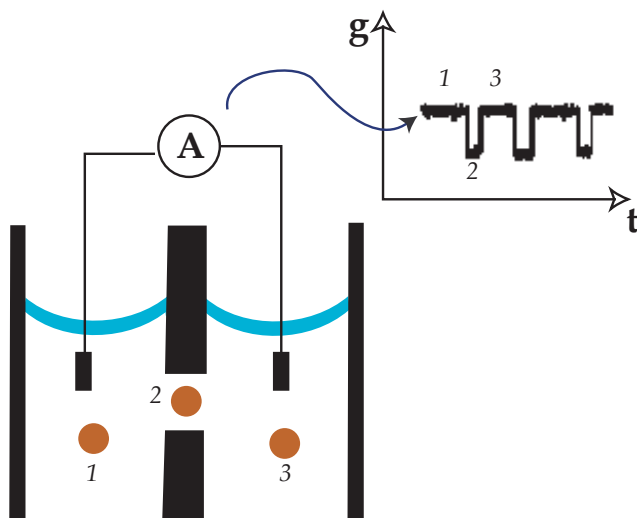


FIGURE 1.1 – Schéma de principe du compteur Coulter et trace de courant associée. (1) : la particule est hors du pore, le courant mesuré est maximal. (2) : la particule est dans le pore, le courant est partiellement bloqué. (3) : la particule est ressortie du pore, le courant a retrouvé son niveau maximal.

mesuré. Le courant retrouve sa valeur maximale lorsque la particule ressort du pore. Le nombre de chutes de courant correspond donc au nombre de particules ayant séjourné dans le pore. En outre la profondeur du bouchage est liée à la taille de la particule, la fréquence des bouchages à la concentration des particules en solution et la durée du bouchage à la vitesse de la particule dans le pore. Il faut noter qu'une baisse du courant ne correspond pas forcément à une traversée du pore : une particule peut entrer dans le pore et ressortir du même côté.

La présence d'une particule dans le pore n'est détectable que si le bouchage du courant est significatif par rapport aux fluctuations de courant

dans le pore libre. Le diamètre du pore doit donc être de l'ordre de la taille de la particule à détecter. Le compteur Coulter a été utilisé pour compter et mesurer des particules de taille micrométrique, comme les cellules sanguines [33, 34]. Dans les années 1970, Deblois et Bean ont affiné la détection en utilisant des pores d'une centaine de nanomètres de diamètre percés dans des membranes de polycarbonate par la méthode du *track-etching* [35, 36]. Après le perçage, tous les pores obtenus ont été bouchés sauf un. Ce dispositif a permis de détecter des colloïdes [35] et des particules virales [36], pour des tailles aussi petites que 60 nm.

À l'échelle moléculaire (de l'ordre du nanomètre) les premiers pores utilisés ont été des pores biologiques. Dès les années 1960 de nombreux indices suggéraient l'existence de protéines formant des canaux pour le passage des ions à travers les membranes lipidiques des cellules [1]. Grâce aux techniques de reconstitution de membranes (bicouches) planes de lipides [37, 38], il a été possible de mesurer *in vitro* le courant circulant à travers un canal membranaire. Hladky et Haydon ont été les premiers à réaliser une telle mesure en 1970, en observant le courant circulant à travers des pores de gramicidine A insérés dans une membrane de lipides reconstituée [9]. La technique du *patch-clamp* initiée par Neher et Sakmann en 1976 [10] a ensuite permis de mesurer le courant à travers des canaux sur des membranes biologiques intactes.

Le blocage temporaire du courant à travers un canal membranaire a été observé pour la première fois par Neher et Steinbach en 1977 [39]. Lors de l'ouverture d'un canal récepteur de l'acétylcholine, un courant de quelques picoampères est temporairement bloqué en présence d'un anesthésique, sur

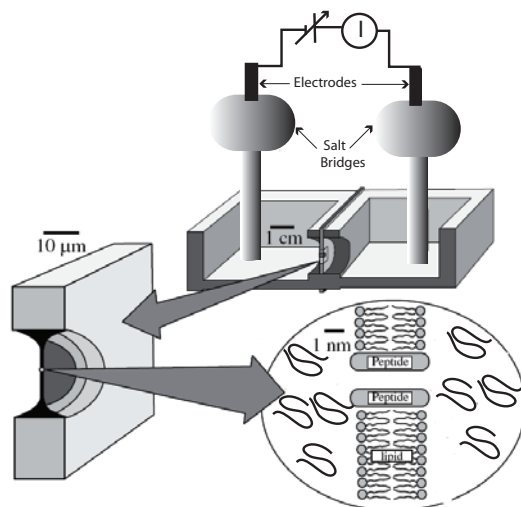


FIGURE 1.2 – Schéma d'un montage typique de détection à l'échelle moléculaire, adapté de Bezrukov *et al* [40]. Vue de la cellule de mesure (en haut) : deux compartiments contenant la solution à analyser sont séparés par une paroi. Deux électrodes appliquent une tension électrique entre les deux compartiments et mesurent le courant résultant. La paroi est percée d'un trou dans lequel une bicouche de lipides est reconstituée (en bas à gauche). Un pore unique de taille nanométrique est inséré dans la bicouche de lipides, dans lequel les molécules en solution peuvent circuler (en bas à droite).

des durées de l'ordre de la milliseconde.

Par la suite des polymères ont été utilisés pour sonder les dimensions internes de différents pores protéiques [14, 15, 16, 17]. L'idée est d'essayer de faire entrer dans le pore des polymères de taille connue de plus en plus gros, jusqu'à ne plus y parvenir.

En 1994 Bezrukov et son équipe ont réalisé la première version moléculaire

du compteur Coulter [40] (fig. 1.2). Le courant circulant à travers un pore unique d'alaméthicine inséré dans une membrane lipidique reconstituée est perturbé par le passage de polymères PEG (polyéthylène glycol) de taille comprise en 5 et 15 Å. La résolution temporelle de l'expérience ne permettait pas de visualiser directement la baisse temporaire de courant due à la présence d'un polymère dans le pore. La présence d'un polymère dans le pore était détectée par son influence sur les différents niveaux de conductance du pore et sur le bruit du courant. Ces mesures ont permis de mesurer le coefficient de diffusion des polymères dans le pore.

Enfin en 1996 Kasianowicz et son équipe ont détecté le passage d'ARN et d'ADN simple brin à travers le pore d' α -hémolysine [11]. La résolution temporelle de l'expérience a permis pour la première fois de distinguer les baisses temporaires de courant dues au passage de molécules individuelles dans le pore (fig. 1.3). De plus une technique d'amplification de l'ADN a été utilisée en sortie de pore pour savoir combien de molécules ont réellement traversé le pore.

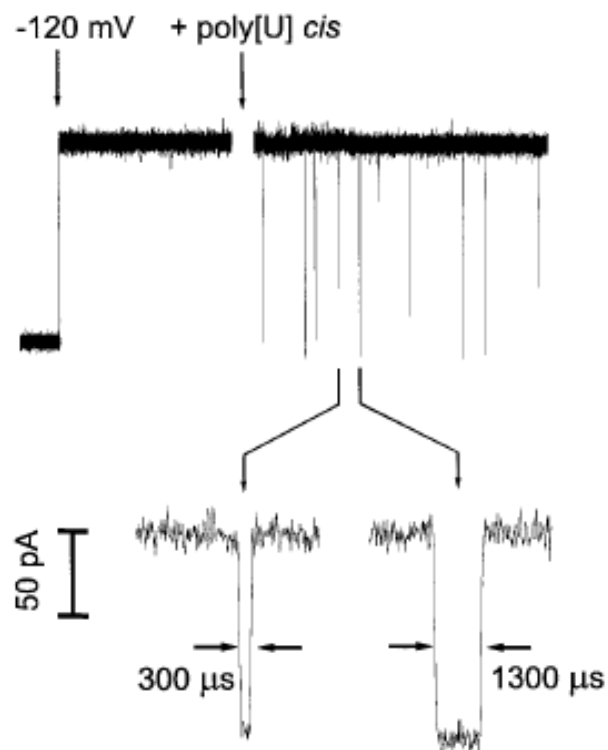


FIGURE 1.3 – Haut : trace de courant typique associée au passage de molécules d'acide polyuridylique ($\text{poly}[\text{U}]_{210}$) à travers le pore d' α -hémolysine. La résolution temporelle de l'expérience permet d'observer chaque baisse temporaire de courant provoquée par la présence d'une molécule dans le pore. Bas : agrandissement de la trace de courant, montrant la durée de deux événements de bouchage. Reproduit de Kasianowicz *et al* [11].

1.2 Nanopores

Depuis les expériences fondatrices, les pores protéiques ont été utilisés dans un grand nombre de travaux pour étudier des polymères neutres [41, 42] ou chargés [43, 44, 45], l'ADN [18, 46, 29, 30], des sucres [47, 48], des peptides [49, 50, 51, 52], des antibiotiques [53, 54] et des protéines [55, 21, 56]. Les pores protéiques sont très reproductibles : deux pores de même nature ont la même géométrie et la même structure chimique. C'est un avantage pour comparer les résultats d'expériences indépendantes. Cependant la variété de pores protéiques utilisables pour la détection à l'échelle moléculaire est limitée. Selon leur nature, les pores protéiques sont également plus ou moins sensibles aux variations de leur environnement (voltage, pH, température, concentration en sel, présence d'un agent dénaturant...). Enfin les membranes de lipides utilisées expérimentalement pour l'insertion des pores sont fragiles.

Une façon de contourner ces limitations est d'utiliser des pores percés dans des membranes solides, dits "pores artificiels" ou "pores solides". En 2001 les premiers pores nanométriques ont été percés dans des membranes de nitrure de silicium à l'aide d'un faisceau d'ions focalisé (FIB) [57]. Aujourd'hui la technique de perçage la plus répandue utilise un faisceau d'électrons produit par un microscope électronique à transmission (TEM) [58]. Une troisième technique de perçage est celle du *track-etching* [35, 59], dans laquelle la membrane solide est percée par un bombardement d'ions lourds avant que les trous ne soient révélés en plongeant la membrane dans une solution d'hydroxyde de sodium. Cependant l'état de surface d'un pore solide est plus difficile à contrôler que celle d'un pore protéique. Par exemple

les ions utilisés pour percer un pore solide peuvent se fixer sur les parois du pore de façon incontrôlée. Ainsi, d'un pore à l'autre, les pores solides sont moins reproductibles que les pores protéiques.

Ces dernières années des modifications de la structure chimique de nanopores protéiques [60, 50, 55] et artificiels [61, 62] ont été réalisées dans le but de mieux contrôler le transport de macromolécules. À l'heure actuelle les dernières innovations portent sur des micropipettes supportant une bicouche lipidique contenant un pore protéique [63], des nanopores hybrides (comme l'insertion dans un pore artificiel d'un pore protéique [64] ou d'un origami d'ADN [65, 66]) ou encore des nanopores bio-inspirés [67, 68] (comme un pore solide dont les parois sont tapissées d'une bicouche de lipides).

Dans notre étude expérimentale nous nous sommes limités à l'utilisation de nanopores protéiques. Parmi les canaux issus de protéines membranaires, on peut distinguer plusieurs classes.

La première est celle des canaux ioniques [1]. Ce sont des protéines, ou assemblage de protéines, formant un canal permettant le passage d'ions à travers les membranes de lipides des cellules. Le type d'ions transportés dépend de la nature du canal : les canaux sont sélectifs. Ce transport sélectif est souvent régulé par la réponse du canal à un paramètre extérieur. On distingue : les canaux mécano-sensibles dont l'ouverture est provoquée par une contrainte sur la membrane de lipides ; les canaux chimio-sensibles dont l'ouverture est provoquée par la liaison d'un ligand à son site récepteur ; les canaux dont l'ouverture est sensible au voltage transmembranaire.

Une autre classe est celle des canaux de diamètre plus importants, parfois spécifiquement appelés "pores" dans la littérature [69]. Certains de ces pores

sont plus ou moins sélectifs et peuvent servir non seulement au transport d'ions mais aussi de protéines, de métabolites (comme les sucres) ou d'eau. On peut citer les porines [70, 54] présentes dans la membrane extérieure des bactéries “à Gram négatif” possédant une double membrane, ou dans la membrane des mitochondries. Il existe également des polypeptides capables de former des pores dans les membranes lipidiques ; ce sont souvent des antibiotiques naturels. Les plus connus d'entre eux sont la gramicidine [9] et l'alaméthicine [40] qui ont longtemps servi de canaux-modèles. Les autres pores, plus passifs, sont des toxines que les bactéries secrètent pour percer la membrane de cellules cibles. On peut citer la toxine du charbon de *Bacillus anthracis*, responsable de l'anthrax, l'aérolysine synthétisée par *Aeromonas hydrophila* ou encore l' α -hémolysine de *Staphylococcus aureus*.

L' α -hémolysine est l'un des pores biologiques les plus utilisés et c'est celui que nous avons utilisé dans nos expériences. Le nanopore d' α -hémolysine est un pore très stable, pouvant rester ouvert pendant plusieurs heures. C'est aussi l'un des pores protéiques les plus résistants aux changements des conditions expérimentales. Enfin l' α -hémolysine est facile à obtenir commercialement. Les principales caractéristiques de ce nanopore sont décrites dans le paragraphe suivant.

Nanopore d' α -hémolysine

L' α -hémolysine [71, 72, 73] est une toxine sécrétée par *Staphylococcus aureus* sous forme de monomères hydrosolubles de masse 33.2 kDa. Au contact d'une membrane cellulaire, sept monomères identiques s'assemblent pour former un canal transmembranaire de 232.4 kDa. Le mécanisme de forma-

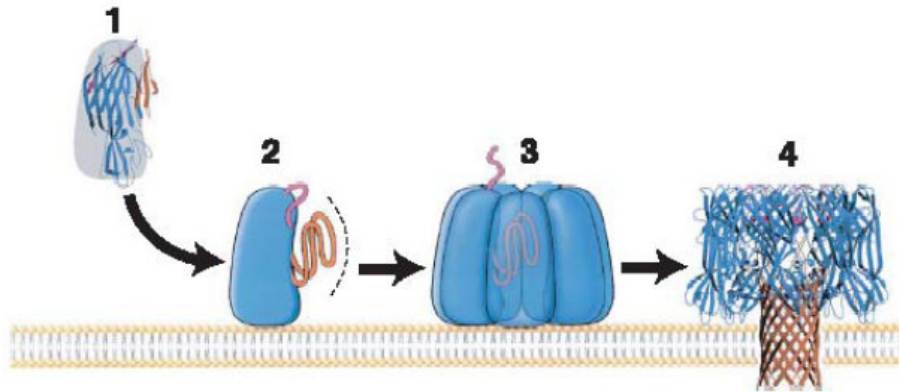


FIGURE 1.4 – Scénario possible de la formation d’un pore d’ α -hémolysine dans une membrane lipidique. (1) : représentation d’un monomère d’ α -hémolysine. (2) : le monomère interagit avec la membrane. (3) : sept monomères se regroupent et forment un pré-pore. (4) : les monomères s’assemblent et forment un pore qui s’insère dans la membrane. Reproduit de Montoya et Gouaux [74].

tion du canal est encore controversé. Un scénario possible [74, 75] est présenté sur la figure 1.4. *In vivo* le pore d’ α -hémolysine s’insère dans la membrane des globules rouges des organismes infectés et provoque leur explosion.

Le pore d’ α -hémolysine est asymétrique, en forme de champignon [71] (fig. 1.5). On distingue trois régions : le chapeau (*cap*), la jante (*rim*) et la tige (*stem*). Le chapeau, ou vestibule, est la partie hydrophile du pore, qui reste à l’extérieur de la membrane. La jante est un domaine hydrophobe situé sous le chapeau qui ancre le pore à la membrane. Enfin la tige est la partie du pore qui traverse la membrane. L’enveloppe extérieure de la tige est hydrophobe et interagit avec la membrane lipidique, tandis que l’intérieur du canal est hydrophile.

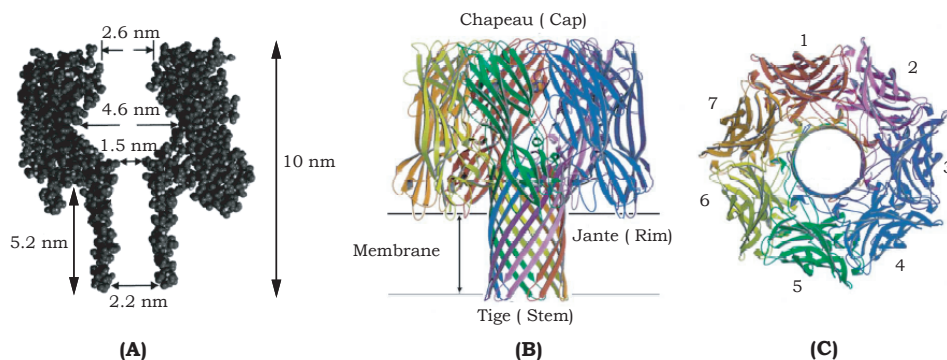


FIGURE 1.5 – Structure du nanopore d' α -hémolysine. Vue en coupe (A), adaptée de Deamer et Branton [80]. Vues de côté (B) et de dessus (C), adaptées de Montoya et Gouaux [74].

La longueur totale du pore est de 10 nm. Le diamètre du canal varie entre 4.6 nm dans le vestibule et 1.5 nm à la constriction entre le vestibule et la tige. En plus de cette asymétrie géométrique, le pore présente une asymétrie électrique : deux anneaux de résidus chargés positivement sont situés au niveau de la constriction et un anneau chargé négativement est situé à l'extrémité extérieure de la tige. À pH neutre la charge globale du pore est positive ($+7e$) [76]. Dans les conditions expérimentales habituelles le transport des anions à travers le pore est favorisé par rapport au transport des cations : le pore d' α -hémolysine est sélectif aux anions [77, 78, 79]. Nous avons montré dans l'article [28] présenté au chapitre 3 que cette sélectivité est plus ou moins importante en fonction du type d'ion utilisé.

La stabilité du pore d' α -hémolysine a été testée sur de grandes gammes de voltage, de pH, de température, de concentration en sel et de concentration en agent dénaturant. Le pore reste ouvert en permanence dans la

gamme de voltage couramment utilisée, de l'ordre de la centaine de millivolts en positif et négatif [77, 30]. Il a néanmoins été montré que la présence de cations divalents ou trivalents pouvait provoquer des fermetures du pore dépendant du voltage appliqué [77]. Le pore est très stable pour un pH neutre ou légèrement basique, mais cette stabilité diminue à pH acide [81, 82]. Le pore supporte des températures allant de 2° C [30] jusqu'à 93° C [83]. Des concentrations en KCl allant de 0.0125 M [43] à 4 M [84, 85] ont pu être utilisées. Le pore reste inséré dans la membrane pour une concentration en agent dénaturant d'au moins 2M pour le guanidium [21] et jusqu'à 7.2 M pour l'urée [86]. Cependant la dénaturation de la partie "chapeau" du pore se produit à partir de 4 M en urée entraînant une modification du courant circulant à travers le pore [86, 87].

1.3 Acquisition des données

Dans notre étude expérimentale, nous avons utilisé un dispositif similaire à celui présenté sur la figure 1.2. Le nanopore est inséré dans une bicouche plane de lipides reconstituée, séparant les deux compartiments remplis de solution (≈ 1 mL par compartiment). Ce montage permet d’avoir accès au contenu de chaque compartiment. Les courants enregistrés durant les expériences sont typiquement de l’ordre de la centaine de picoampères. Le signal mesuré par les électrodes est amplifié, puis filtré avant d’être converti en signal numérique par une carte d’acquisition et enfin visualisé et traité sur ordinateur à l’aide de logiciels adaptés. Le détail du matériel et des réglages que nous avons utilisés est donné dans la section *Materials and methods* de l’article [28] présenté au chapitre 3. Mentionnons simplement que le signal est typiquement filtré à 10 kHz et que la fréquence d’échantillonnage de la carte d’acquisition est fixée à 250 kHz.

À cause de l’agitation thermique régnant dans le système le passage de macromolécules, même de nature identique, à travers le nanopore est un processus stochastique : l’intervalle de temps entre deux bouchages et la durée de bouchage varient. L’analyse du processus de translocation n’est donc pas basée sur un événement de bouchage unique, mais sur un ensemble statistique d’événements. Un ensemble de 2000 événements fournit une statistique fiable. Le courant à travers le pore doit être enregistré suffisamment longtemps pour observer un nombre suffisant de bouchages. La durée d’enregistrement dépend essentiellement de la concentration des macromolécules en solution. Une fois la trace de courant obtenue, les événements de bouchage doivent être séparés des fluctuations de courant à travers le pore libre.

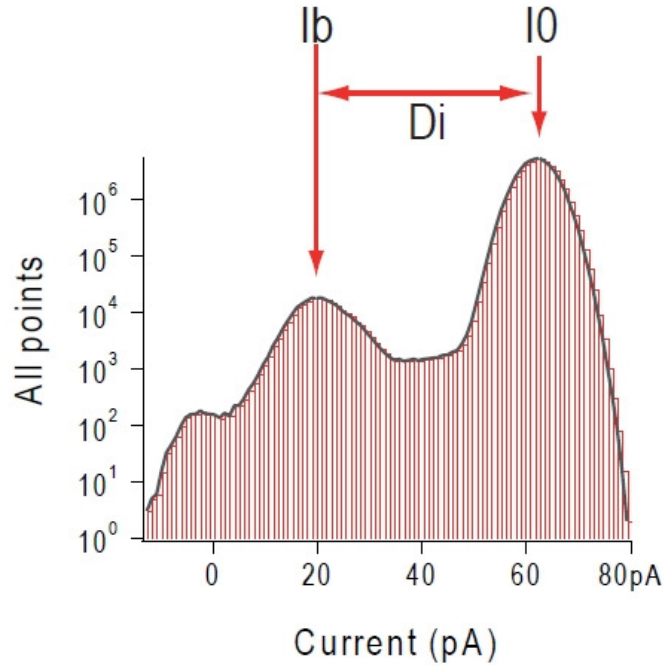


FIGURE 1.6 – Distribution des courants mesurés [28] : I_0 est le courant du pore libre et I_b celui du pore partiellement bouché par une macromolécule.

La distribution des courants mesurés met en lumière l'existence de deux populations principales : l'une correspond au pore libre (I_0), l'autre au pore partiellement bouché par une macromolécule (I_b) (fig. 1.6). Un premier seuil est utilisé pour sortir du bruit du pore libre : tous les événements dont le niveau de courant est supérieur à $I_0 - 3\sigma$ sont éliminés, σ étant la déviation standard autour de I_0 . Un second seuil est utilisé pour éliminer les bouchages faibles, dûs aux collisions de macromolécules contre l'entrée du pore, et ne garder que les bouchages profonds dûs à la présence d'une macromolécule dans le pore : tous les événements dont le niveau de courant est supérieur à $\frac{I_0 + I_b}{2}$ sont éliminés [28].

Deux quantités sont particulièrement intéressantes : la fréquence d'entrée et le temps de résidence des molécules dans le pore.

La fréquence moyenne d'entrée f peut être calculée directement à partir de la trace de courant en divisant le nombre de bouchages observés par la durée totale d'observation. Une autre méthode utilise la distribution des temps T_i entre deux bouchages successifs (fig. 1.7). Cette distribution est correctement ajustée par la relation :

$$\text{number of events} = A \exp \left(-\frac{T_i}{\langle T_i \rangle} \right) \quad (1.1)$$

où $\langle T_i \rangle$ est la valeur moyenne de T_i et A un préfacteur. Cette relation traduit que les entrées de molécules dans le pore sont décorréées : la concentration des molécules en solution est suffisamment faible pour qu'elle n'interagissent pas entre elles. La fréquence moyenne d'entrée f est l'inverse du temps moyen entre bouchages $\langle T_i \rangle$. Nous avons retenu la moyenne des fréquences obtenues par les deux méthodes mentionnées.

La distribution des temps de bouchage T_t permet d'obtenir le temps moyen de résidence d'une molécule dans le pore $\tau_{res} = \langle T_t \rangle$ (fig. 1.7). À nouveau la distribution est ajustée par :

$$\text{number of events} = B \exp \left(-\frac{T_t}{\langle T_t \rangle} \right) \quad (1.2)$$

Parfois deux populations de temps de bouchage sont visibles sur la distribution, chacune ajustable par l'équation 1.2 avec son propre temps caractéristique. Les événements courts sont alors assimilés à de brèves insertions de molécules dans le pore, qui ressortent rapidement du côté initial, tandis que les événements longs correspondent aux molécules traversant le pore. Lorsqu'une mesure directe du nombre de molécules dans chaque compartiment est délicate, cette distinction peut être confortée par l'analyse de la profondeur des bouchages observés : seuls les bouchages les plus

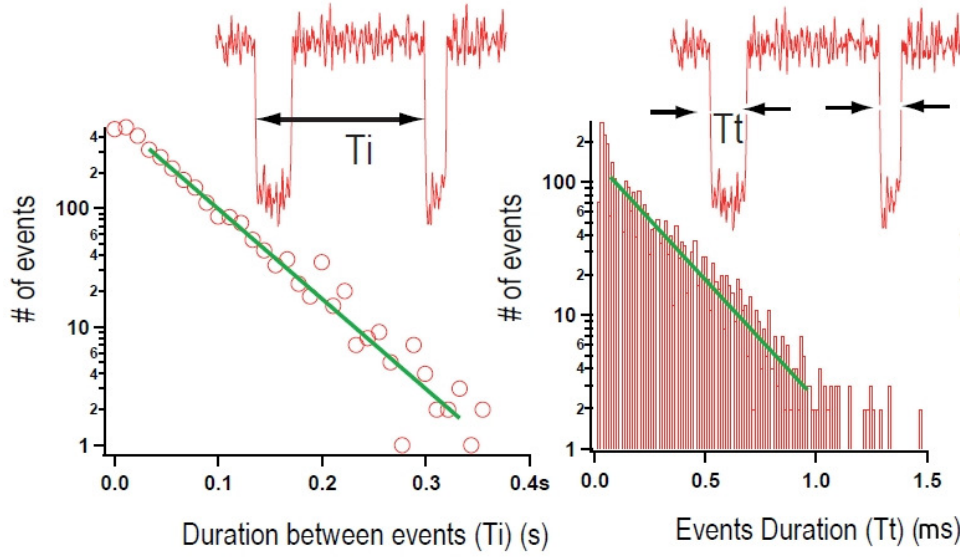


FIGURE 1.7 – Distribution des temps entre deux bouchages successifs T_i (gauche) et des temps de bouchage T_t (droite) [28]. Les lignes épaisses correspondent aux ajustements des distributions par l'équation 1.1 (gauche) et par l'équation 1.2 (droite).

profonds sont interprétés comme des traversées du pore [88]. Par ailleurs différentes formes de la distribution des temps de bouchage ont été observées, dépendant probablement de l'interaction entre la molécule et le pore [89].

Par souci de simplicité, dans tout ce qui suit les fréquences et les temps mentionnés correspondent à leur valeur moyenne, sauf mention explicite.

Chapitre 2

Revue du processus de translocation

Le processus de transport d'une macromolécule à travers un nanopore peut être divisé en plusieurs étapes : i) la diffusion de la molécule de la solution (bulk) jusqu'à l'entrée du pore, ii) l'entrée de la molécule dans le pore et iii) la résidence de la molécule dans le pore. Les deux premières étapes correspondent à la capture de la molécule par le pore, caractérisée expérimentalement par la fréquence de bouchage du courant à travers le pore. La résidence est quant à elle caractérisée expérimentalement par la durée du bouchage et est liée à la dynamique de la molécule dans le pore.

L'analyse et l'interprétation de la dépendance de la fréquence d'entrée et du temps de résidence en fonction de certains paramètres expérimentaux ajustables (la dimension du pore, le voltage appliqué, la température, le pH...) permettent de dégager les principaux effets en jeu dans une expérience donnée. Par exemple le confinement d'une molécule dans un pore plus pe-

tit qu'elle se heurte à une résistance entropique, qui favorise la sortie de la molécule du pore [90, 91]. Par ailleurs il existe généralement une force aidant ou s'opposant au passage des macromolécules à travers un nanopore. On peut citer le champ électrique à l'intérieur du pore [11, 46, 29], l'asymétrie dans les conditions régnant de part et d'autre du pore [92, 93, 94], ou l'interaction entre la molécule et les parois du pore [89, 95, 96, 97, 98].

Beaucoup d'études théoriques ont été menées, en particulier depuis les années 1970 avec les travaux de de Gennes [99], pour décrire les propriétés statiques et dynamiques de macromolécules en solution ou en milieu confiné. La grande variété de résultats expérimentaux disponibles montre qu'il n'existe pas de comportement universel pour décrire le passage d'une macromolécule dans un nanopore. Les résultats sont très sensibles à la nature du système (molécule, pore, solvant, ions...) et aux conditions employées. On peut néanmoins distinguer quelques grands régimes caractérisant le processus de capture et la dynamique d'une molécule dans le pore. Ces régimes sont décrits au début de ce chapitre et interprétés à l'aide de petits modèles reliant les quantités observables aux paramètres de l'expérience. Une partie est ensuite consacrée aux modèles plus détaillés de la translocation, nécessaires quand la situation ne correspond pas clairement à l'un des grands régimes mentionnés. Une attention particulière est portée au modèle de Fokker-Planck [90, 91], avant de présenter les méthodes de simulation les plus couramment utilisées. Enfin sont détaillés les principaux effets qui peuvent influencer sur le passage des molécules dans le pore, dont l'importance relative est à l'origine du régime de transport observé.

2.1 Grands régimes et petits modèles

2.1.1 Capture d’une macromolécule par un nanopore

Le processus de capture d’une macromolécule par un nanopore a reçu beaucoup d’attention pour essayer de comprendre les effets qui gouvernent l’entrée de grandes molécules dans des pores très petits. De plus la fréquence d’entrée des molécules dans le pore détermine la concentration minimale de molécules nécessaire pour acquérir une statistique fiable au cours d’une expérience. Ceci est particulièrement important lorsque les espèces à analyser sont coûteuses. Dans cette section nous considérons d’abord le nombre de particules par unité de temps atteignant le pore, ou la zone de capture du pore, en diffusant depuis la solution contenue dans le compartiment initial. Il arrive souvent que la fréquence d’entrée observée soit très inférieure à la fréquence estimée d’arrivée des molécules près du pore par diffusion. Cela peut venir d’une résolution temporelle insuffisante, qui fait que certains passages de molécules ne sont pas vus [53, 100]. Une autre possibilité est l’existence d’une barrière d’énergie libre résistant à l’entrée des molécules dans le pore, qui fait que seule une partie des molécules qui se présentent à l’entrée du pore parvient à rentrer. Le phénomène de barrière d’entrée est détaillé dans le dernier paragraphe.

Diffusion libre

Le régime le plus simple est l’entrée d’une macromolécule dans un nanopore par diffusion libre. La molécule diffuse depuis le compartiment initial jusqu’à l’entrée du pore, dans lequel elle pénètre ou non dans son mouvement diffusif. La fréquence d’entrée ne dépend alors que des caractéristiques

de diffusion des molécules en solution et de la taille de l'ouverture du pore. En particulier la fréquence d'entrée ne dépend pas du voltage appliqué dans le pore (fig. 2.1). La fréquence d'entrée f peut être estimée en considérant le nombre de molécules arrivant par unité de temps sur une entrée de pore hémisphérique [101, 102]; en régime permanent il existe un gradient de concentration en molécules entre la région loin du pore (concentration C constante) et le pore où les particules disparaissent (concentration nulle). En considérant la région loin du pore comme étant à distance infinie du pore, la concentration c en molécules varie avec la distance r de l'entrée du pore selon :

$$c(r) = C(1 - \frac{r_{pore}}{r}) \quad (2.1)$$

où r_{pore} est le rayon du pore. Le nombre de particules atteignant le pore par unité de temps est alors :

$$f = 2\pi r_{pore} D_{diff} C \quad (2.2)$$

où D_{diff} est le coefficient de diffusion d'une molécule dans le compartiment initial.

Zone de capture

Dans certains cas la zone de capture des molécules par le pore peut être plus étendue que la région immédiatement à l'entrée du pore [104, 105, 106, 107]. Le rayon de capture r_c remplace alors le rayon du pore r_{pore} dans l'équation 2.2. Par exemple l'extension du champ électrique à l'extérieur du pore peut permettre de capturer des molécules chargées [105, 106, 107]. Dans ce cas r_c augmente linéairement avec le voltage appliqué [106], et de même

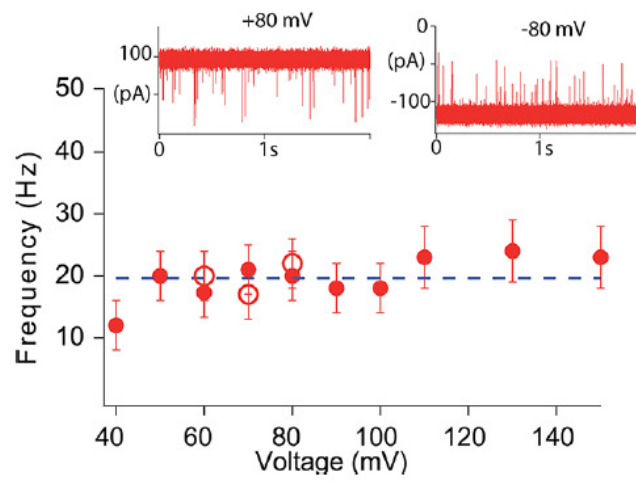


FIGURE 2.1 – Résultats expérimentaux de Breton *et al* [103] pour la fréquence d'entrée de polymères PEG 2000 dans le nanopore d' α -hémolysine en présence de 2M LiCl en fonction du voltage appliqué à travers le pore (les cercles pleins et vides distinguent les voltages positifs et négatifs). La fréquence d'entrée est indépendante du voltage appliqué, traduisant un régime d'entrée purement diffusif.

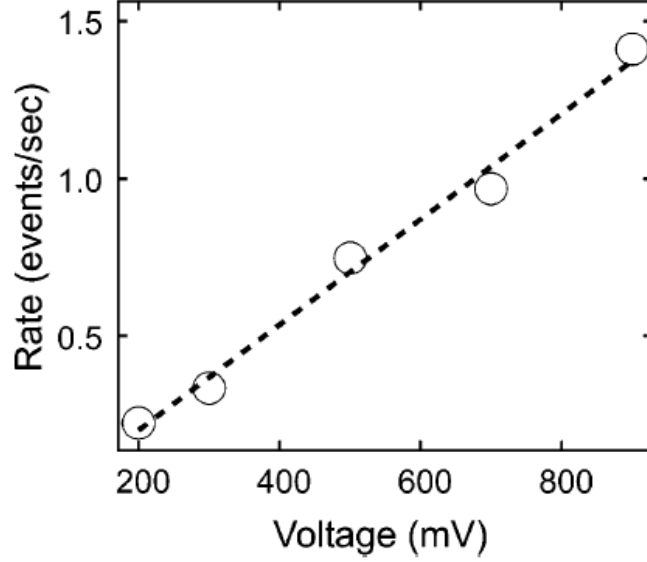


FIGURE 2.2 – Résultats expérimentaux de Chen *et al* [109] pour la fréquence d’entrée de λ -ADN (48.5 kbp) dans un nanopore solide de 15 nm de diamètre en fonction du voltage appliqué. La fréquence d’entrée dépend linéairement du voltage appliqué.

pour la fréquence d’entrée (fig. 2.2). L’extension de la zone de capture peut également être due à l’existence d’un écoulement électroosmotique à travers le pore [108], provoquant un entraînement près de l’entrée du pore, ou bien à une interaction attractive entre les molécules et le pore [60].

Barrière d’entrée

Le plus souvent la fréquence d’entrée est inférieure à la fréquence estimée d’arrivée des molécules près du pore par diffusion, et présente une dépendance exponentielle avec certains paramètres de l’expérience, tel que le voltage appliqué [46, 110, 103, 24] (fig. 2.3). Ce comportement est habi-

tuellement interprété comme l'existence d'une barrière d'énergie libre ΔF s'opposant à l'entrée de la molécule dans le pore [46, 111, 110, 103, 24]. Plus la barrière est haute, plus la fréquence d'entrée est faible. La fréquence d'entrée s'écrit :

$$f = f_0 \exp \left(-\frac{\Delta F}{k_B T} \right) \quad (2.3)$$

où f_0 est la fréquence typique à laquelle la molécule essaie de franchir la barrière, k_B est la constante de Boltzmann et T la température. Si les dimensions de la molécule en solution sont supérieures à celles du pore, la barrière contient une contribution d'origine entropique, correspondant au travail nécessaire pour confiner la molécule dans le pore [46, 110, 103, 24]. Une interaction entre la molécule et le pore, par exemple d'origine électrostatique si la molécule et le pore sont chargés, peut également contribuer à la barrière [46]. L'effet du champ électrique sur une molécule chargée peut aider la molécule à entrer dans le pore en diminuant la barrière d'entrée [46, 111, 103]. Dans ce cas l'équation 2.3 devient :

$$f = f_0 \exp \left[-\left(\frac{U^* - qV}{k_B T} \right) \right] \quad (2.4)$$

où U^* contient les contributions autres que celle de la force électrique à la barrière d'entrée (entropie, interaction avec le pore par exemple) et $-qV$ est la diminution de la barrière due à l'action du champ électrique sur la molécule, q étant la charge effective de la molécule interagissant avec le voltage V appliqué. Si le champ électrique est assez fort, la barrière d'entrée est effacée et on retrouve un régime où les molécules sont capturées sans résistance par le pore.

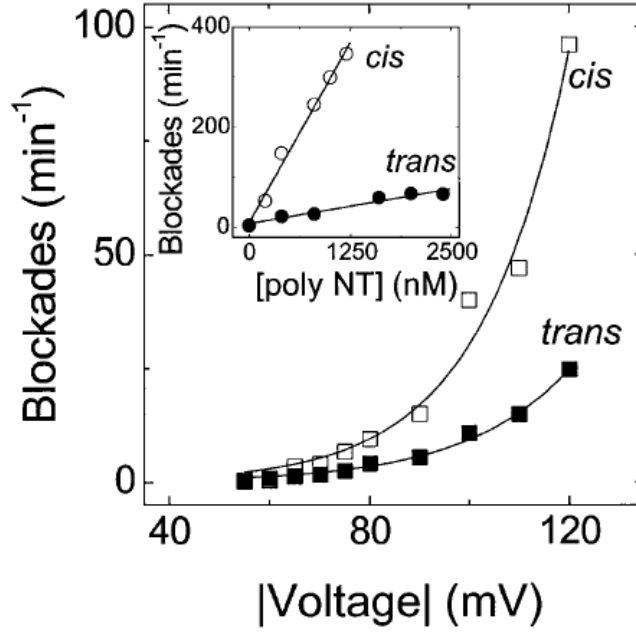


FIGURE 2.3 – Résultats expérimentaux de Henrickson *et al* [46] pour la fréquence d'entrée d'ADN simple brin dans le nanopore d' α -hémolysine en fonction du voltage appliqué et du côté d'entrée dans le pore (carrés vides : 400 nM d'ADN côté vestibule du pore ; carrés pleins : 800 nM d'ADN côté tige du pore). La fréquence d'entrée augmente exponentiellement avec le voltage appliqué traduisant un régime de barrière d'entrée. Dans cette expérience le champ électrique est toujours orienté de façon à aider l'entrée de l'ADN dans le pore. Les différences observées en fonction du côté d'entrée dans le pore sont discutées dans la section 2.3.

2.1.2 Dynamique d'une macromolécule dans un nanopore

La compréhension du processus de transport d'une macromolécule dans un nanopore est nécessaire pour relier les observations expérimentales de durée et profondeur de bouchage du courant avec l'évolution de la position et de la conformation de la molécule durant son séjour dans le pore.

Diffusion libre

Le régime de transport le plus simple à considérer est celui où la molécule traverse le pore en diffusant librement. Dans ce cas le temps de résidence de la molécule dans le pore ne dépend pas de facteurs tels que le voltage appliqué (fig. 2.4). Pour un pore long par rapport aux dimensions de la molécule, le temps de résidence s'écrit alors [103] :

$$\tau_{res} = \frac{l_{pore}^2}{D_{diff}} \quad (2.5)$$

où l_{pore} est la longueur du pore et D_{diff} est le coefficient de diffusion de la molécule dans le pore, qui peut être très différent de sa valeur en volume à cause du confinement [40, 108]. Le coefficient de diffusion est lié au coefficient de frottement fluide ζ de la solution sur la molécule [112, 113] :

$$D_{diff} = \frac{k_B T}{\zeta} \quad (2.6)$$

Dans l'approximation d'une molécule globalement sphérique de rayon hydrodynamique r_H , on obtient [114] :

$$D_{diff} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (2.7)$$

où η est la viscosité de la solution. Si le rayon de la molécule est plus petit que celui du pore, la molécule conserve sa forme sphérique dans le pore et l'équation 2.7 permet d'estimer la viscosité de la solution dans le pore.

Électrophorèse

Quand la force qui aide la molécule à traverser le pore est grande, la traversée du pore est rapide et correspond au régime électrophorétique. La

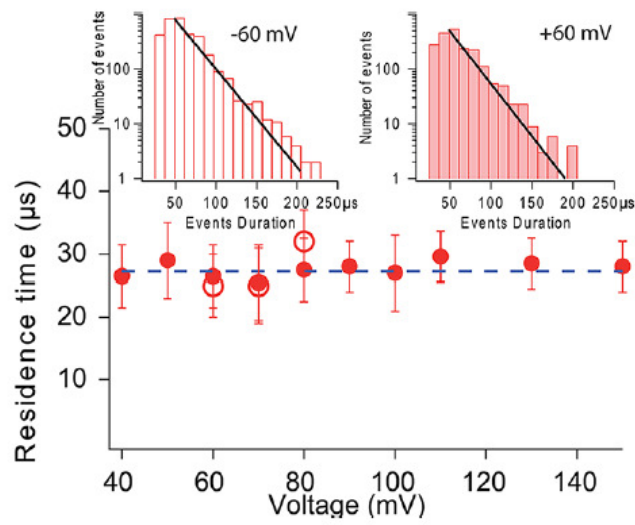


FIGURE 2.4 – Résultats expérimentaux de Breton *et al* [103] pour le temps de résidence de polymères PEG 2000 dans le nanopore d' α -hémolysine en présence de 2M LiCl en fonction du voltage appliqué à travers le pore (les cercles pleins et vides distinguent les voltages positifs et négatifs). Le temps de résidence est indépendant du voltage appliqué, traduisant un régime de transport purement diffusif.

vitesse v de la molécule dans le pore résulte de l'équilibre entre la force de traction \mathcal{F} et les forces de frottement fluide dues au déplacement de la molécule dans la solution :

$$\mathcal{F} = \zeta v \quad (2.8)$$

où ζ est le coefficient de frottement fluide de la solution sur la molécule. Le temps de résidence vaut alors :

$$\tau_{res} = \frac{d}{v} = \frac{d}{\mathcal{F}} \zeta = \frac{d}{\mathcal{F}} \frac{k_B T}{D_{diff}} \quad (2.9)$$

Dans le régime électrophorétique le temps de résidence est inversement proportionnel à la force appliquée [115] (fig. 2.5). Cette force peut par exemple provenir de l'action du champ électrique dans le pore sur une molécule chargée :

$$\mathcal{F} = qE = q \frac{V}{l_{pore}} \quad (2.10)$$

où q est la charge de la molécule interagissant avec le champ électrique E dû à une différence de potentiel V appliquée à travers le pore de longueur l_{pore} . L'équation 2.9 permet également de déterminer le coefficient de diffusion D_{diff} dans le pore.

La distance d parcourue pendant la durée du bouchage dépend de la configuration de la molécule dans le pore.

Si la molécule dans le pore peut être considérée comme une sphère de rayon hydrodynamique r_H , le temps de résidence correspond au temps nécessaire à la molécule pour parcourir la longueur du pore :

$$\tau_{res} = \frac{l_{pore}}{v} = \frac{l_{pore}}{\mathcal{F}} \zeta = \frac{l_{pore}}{\mathcal{F}} 6\pi\eta r_H \quad (2.11)$$

En revanche si la molécule traverse le pore dans une configuration étirée sous

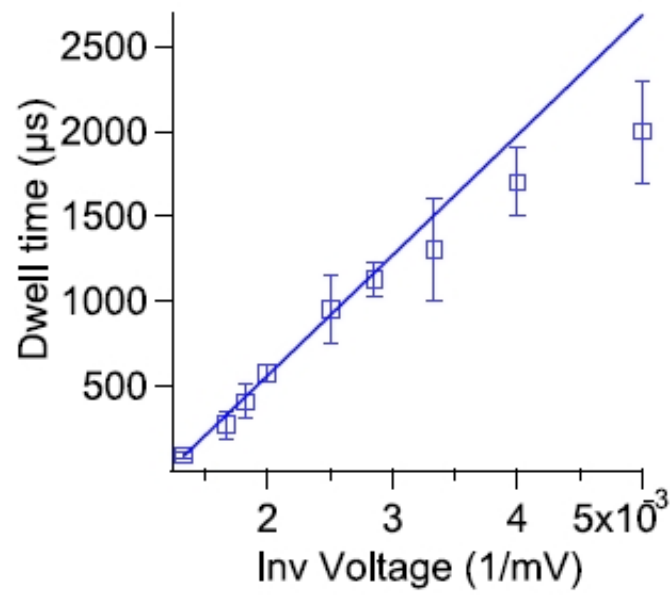


FIGURE 2.5 – Résultats expérimentaux de Cressiot *et al* [24] pour le temps de translocation de protéines MaleE dépliées à travers un nanopore solide en fonction de l'inverse du voltage appliqué. Aux forts voltages le comportement linéaire observé traduit un régime de transport électrophorétique.

l'effet de la force de traction [29], le coefficient de frottement fluide est modifié par rapport au cas d'une molécule sphérique. On peut citer le modèle de Rouse [116], où le frottement total est la somme des frottements exercés sur chaque élément de la molécule. Le temps de résidence correspond au temps nécessaire pour faire passer toute la longueur L de la molécule dépliée à travers le pore, soit une distance totale égale à $L + l_{pore}$. Le temps de résidence est proportionnel à la longueur de la molécule.

Barrière

Dans certains cas le temps de résidence présente une dépendance exponentielle avec certains paramètres de l'expérience, tel que le voltage appliqué [24, 103, 117] (fig. 2.6) ou la longueur de la molécule [88, 84, 30]. Ce comportement est habituellement interprété comme l'existence d'une barrière d'énergie libre ΔF s'opposant au transport de la molécule dans le pore [90, 91, 24, 88, 84]. On peut penser par exemple à une interaction attractive entre la molécule et les parois du pore qui s'oppose à la sortie de la molécule [84, 117, 96]. Plus la barrière est haute, plus le temps de résidence est long. Si la barrière est grande comparée à l'énergie thermique de la molécule, le temps de résidence de la molécule dans le pore est essentiellement consacré à tenter de franchir cette barrière. Le temps de résidence peut alors être estimé par :

$$\tau_{res} = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \quad (2.12)$$

où τ_0 est un temps typique d'essai de franchissement de la barrière, k_B est la constante de Boltzmann et T la température. De manière analogue au processus de capture (voir section 2.1.1) une force favorisant la traversée du

pore par la molécule diminue la barrière. Si cette aide vient du voltage V appliqué à travers le pore agissant sur la charge q d'une molécule [24, 103], on obtient :

$$\tau_{res} = \tau_0 \exp\left(\frac{U^* - qV}{k_B T}\right) \quad (2.13)$$

où U^* contient les contributions à la barrière autres que l'effet de la force électrique sur la molécule. Le temps de résidence diminue exponentiellement avec le voltage appliqué.

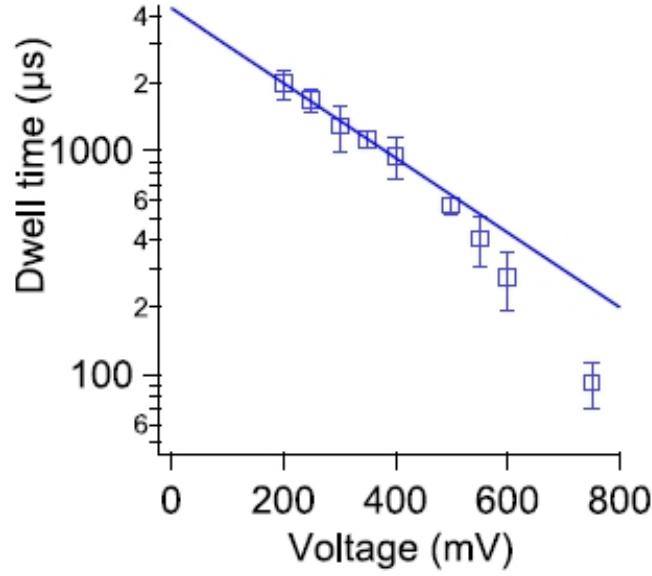


FIGURE 2.6 – Résultats expérimentaux de Cressiot *et al* [24] pour le temps de translocation de protéines MalE dépliées à travers un nanopore solide en fonction du voltage appliqué. Aux faibles voltages la décroissance exponentielle observée traduit un régime de barrière.

2.2 Autres modèles

Parfois les variations du paysage énergétique parcouru par la molécule pendant son transport à travers le pore ne permettent pas d’observer l’un des grands régimes décrits dans la section précédente. Une modélisation plus détaillée du processus est alors nécessaire. La plupart des modèles développés sont concentrés sur la dynamique de transport de la molécule à travers le pore. L’état initial du système correspond généralement à une extrémité de la molécule prête à entrer dans le pore. D’un point de vue analytique, les modèles de type Fokker-Planck ont été et sont toujours largement utilisés. Une autre approche consiste à simuler informatiquement le système expérimental et son évolution, avec un niveau de détail plus ou moins grand.

2.2.1 Modèle de Fokker-Planck

Les travaux de Sung et Park en 1996 [90] puis de Muthukumar [91, 118] sont à l’origine du modèle présenté ici. Notre présentation se limite aux idées directrices et aux principaux résultats du modèle.

Le passage d’un polymère à travers un trou dans une membrane est considéré (fig. 2.7). Le polymère contient N monomères identiques, dont n ont franchi le trou à un instant donné ($n = 0$ à l’instant initial). L’idée est de décrire la traversée du polymère par l’évolution temporelle d’une seule variable P_n représentant la probabilité que n monomères aient traversé le pore et se trouvent dans le compartiment final à un instant donné. L’évolution temporelle de P_n est donnée par la progression du polymère à travers le paysage d’énergie libre qu’il rencontre au cours de sa traversée du trou. La dynamique de la molécule entière est donc réduite à la diffusion de son centre

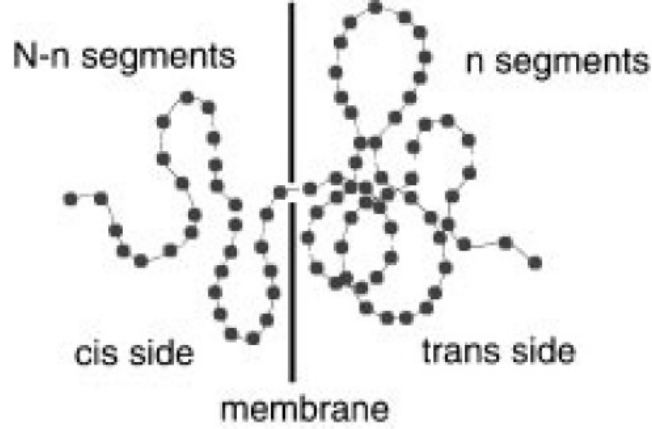


FIGURE 2.7 – Schéma représentant le passage d'un polymère à travers un trou dans une membrane, avec $N - n$ monomères dans le compartiment initial et n monomères dans le compartiment final. Reproduit de [90].

de masse dans le paysage d'énergie libre. Le temps moyen nécessaire pour observer une configuration où n monomères ont traversé (temps moyen de premier passage) peut être calculé. En particulier le temps de translocation τ du polymère correspond à $n = N$ et s'écrit [119] :

$$\tau = \frac{1}{u} \int_0^N \exp\left(\frac{F_{n1}}{k_B T}\right) dn_1 \int_0^{n1} \exp\left(-\frac{F_{n2}}{k_B T}\right) dn_2 \quad (2.14)$$

où u est le taux d'ajout d'un monomère aux n présents dans le compartiment final et F_n est l'énergie libre de la chaîne avec n monomères dans le compartiment final.

Dans le cas considéré sur la figure 2.7, on a [91] :

$$\frac{F_n}{k_B T} = (\gamma - 1) \ln(N - n) + (\gamma - 1) \ln(n) + \frac{n}{k_B T} \Delta\mu \quad (2.15)$$

où les premiers et deuxièmes termes représentent respectivement l'énergie libre entropique de la portion de polymère dans le compartiment initial

et final, chaque portion de polymère ayant une extrémité “attachée” au trou et évoluant dans un demi-espace limité par la membrane, et le dernier terme traduit l’existence d’une différence de potentiel chimique entre le compartiment initial et final. La valeur de l’exposant de surface γ dépend de la nature des interactions entre monomères et de la dimension de l’espace considérée ($\gamma=0.69$ pour une chaîne de monomères auto-évitante à deux dimensions [120]). Il est important de noter que le modèle suppose qu’à chaque instant du processus le polymère est dans un état de quasi-équilibre, qui lui laisse le temps d’explorer toutes les configurations possibles. Les forces aidant le polymère à traverser le trou doivent être suffisamment faibles pour rendre cette approximation valable.

Le modèle a été utilisé dans la forme présentée ci-dessus pour calculer le temps de translocation du polymère à travers le trou pour quelques valeurs particulières de $\Delta\mu$ [91]. Dans le cas diffusif $\Delta\mu = 0$, la relation $\tau \sim N^2$ a été obtenue. Dans le cas d’une grande différence de potentiel chimique favorisant la translocation, la relation $\tau \sim N$ a été obtenue. Bien qu’il soit naturel d’attendre un temps de translocation proportionnel au nombre de monomères lorsque le polymère est tiré fortement à travers le trou (régime électrophorétique), l’approximation de quasi-équilibre du polymère à chaque instant du processus, et donc la validité du modèle utilisé, est dans ce cas discutable.

En 2003 le modèle a été modifié pour décrire le passage d’un polymère non plus dans un trou mais dans un pore d’une certaine longueur [121]. La contribution du champ électrique à l’intérieur du pore agissant sur un polymère chargé a été ajoutée à l’énergie libre du polymère. Cette nouvelle

version du modèle a été en particulier utilisée pour étudier le temps de translocation de polymères plus courts ou plus longs que le pore [121].

2.2.2 Simulations

La simulation informatique peut permettre, en fonction du niveau de détail utilisé, de suivre à une échelle inaccessible expérimentalement l'évolution du système dans une expérience de translocation donnée (par exemple suivre la trajectoire des ions dans le pore [122, 123]) ou de tester qualitativement l'influence d'un paramètre sur un système modèle (par exemple l'effet d'une attraction entre la molécule et le pore [97, 98]). Les grandes classes de simulations que l'on peut distinguer sont présentées, avec leurs caractéristiques, avantages et inconvénients. Une description plus détaillée peut être trouvée dans les références [124, 125] par exemple.

La première classe de simulations est celle des simulations dites “tout-atome”. Le système expérimental est reproduit avec une précision d'ordre atomique (fig. 2.8). Le système évolue selon une “dynamique moléculaire”, générée à partir de l'ensemble des forces appliquées sur chaque atome par son environnement. L'avantage de cette technique est d'accéder à un grand niveau de détail du processus simulé. Cependant une telle précision requiert de grosses ressources informatiques, ce qui peut limiter l'utilisation de la méthode. Par exemple la simulation du courant ionique circulant à travers le canal de la porine MspA insérée dans une bicouche lipidique contient environ 350.000 atomes et nécessite 10 jours de calcul sur 1024 CPU pour simuler les 100 ns de temps réel nécessaires pour obtenir une mesure fiable

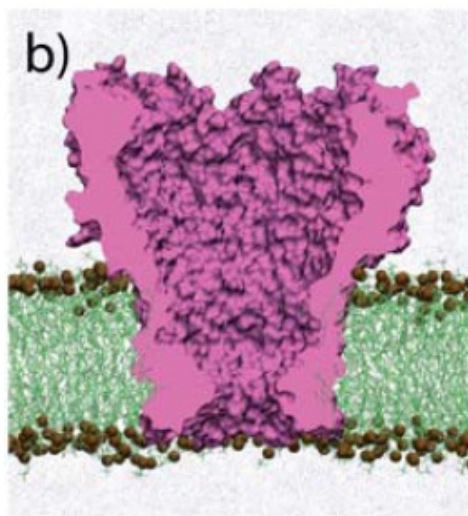


FIGURE 2.8 – Modèle tout-atome de la porine MspA insérée dans une bicouche lipidique. Reproduit de [124].

de la conductance du pore sous un voltage de 200mV [124].

La seconde classe de simulations est celle des simulations dites “à gros grain”, que nous avons utilisées dans les chapitres 4 et 5. Cette approche utilise une représentation moins détaillée du système, tout en permettant d’incorporer quelques grandes caractéristiques structurales. La molécule transportée et le pore sont souvent représentés comme un assemblage de “perles” (*bead*), chaque perle regroupant plusieurs atomes (fig. 2.9). Le plus faible niveau de détail réduit le temps de calcul nécessaire pour simuler l’évolution du système. Le prix à payer est une analyse moins fine du phénomène que dans les simulations tout-atome, interdisant toute comparaison directe avec une expérience réelle. Les simulations à gros grain sont un moyen efficace d’évaluer qualitativement l’influence d’un paramètre de l’expérience et de

dégager les grandes lignes d'un phénomène en un temps de simulation raisonnable. Par ailleurs un gain de temps supplémentaire peut être obtenu en jouant sur la façon de générer la dynamique du système. Contrairement à la dynamique moléculaire, les dynamiques “brownienne” [95] ou “de Langevin” [126] réduisent l'effet du solvant à une force aléatoire agissant sur la molécule. Une autre possibilité est une dynamique de “Monte Carlo” [127], où l'évolution du système dépend des variations d'énergie libre entre les différents états accessibles. Dans ce cas le système est supposé être en état de quasi-équilibre à chaque instant.

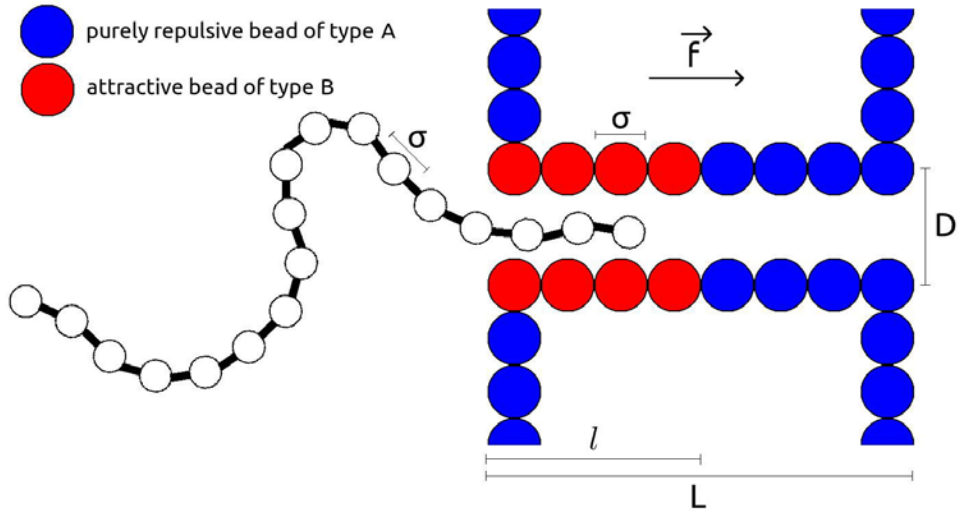


FIGURE 2.9 – Modèle à gros grain de la translocation d'un polymère à travers un pore inséré dans une membrane [31].

Enfin une troisième classe de simulations est celle des simulations “multi-échelles”. Ces simulations allient la précision des modèles tout-atome et la rapidité de calcul des modèles à gros grain en combinant une représentation

détaillée du système dans les zones d'intérêt majeur (comme l'intérieur du pore par exemple) et une représentation plus grossière du reste du système. Cependant cette classe de simulations reste à ce jour la moins développée.

2.3 Effets en jeu

Les expériences réalisées jusqu'à aujourd'hui ont montré qu'un grand nombre de paramètres pouvaient avoir une influence sur le transport de macromolécules à travers un nanopore. En fonction de l'importance relative des forces en présence, le comportement des grandeurs observables (fréquence d'entrée et temps de résidence) en fonction des paramètres de l'expérience peut être modifié. Quelques-uns des effets les plus importants, dont certains ont déjà été évoqués dans les sections précédentes, sont présentés ici.

2.3.1 Voltage

Action sur une molécule chargée

Un des premiers effets mis en évidence est l'effet du champ électrique généré par le voltage appliqué à travers le pore sur le transport d'une molécule chargée. Cet effet a déjà été évoqué plusieurs fois dans les sections précédentes et ne sera que rapidement repris ici. Un exemple historique est l'expérience réalisée par Kasianowicz *et al* [11] en 1996 où de l'ADN simple brin (chargé négativement) a été transporté sous l'effet du champ électrique à travers le nanopore d' α -hémolysine. Dans cette expérience le temps de résidence de l'ADN dans le pore est inversement proportionnel au voltage

appliqué (fig. 2.10). Nous avons vu dans la section 2.1 que le champ électrique pouvait faciliter non seulement le transport d’une molécule chargée à travers le pore [11, 24] (fig. 2.5 et 2.6) mais également l’entrée de la molécule dans le pore [109, 46] (fig. 2.2 et 2.3).

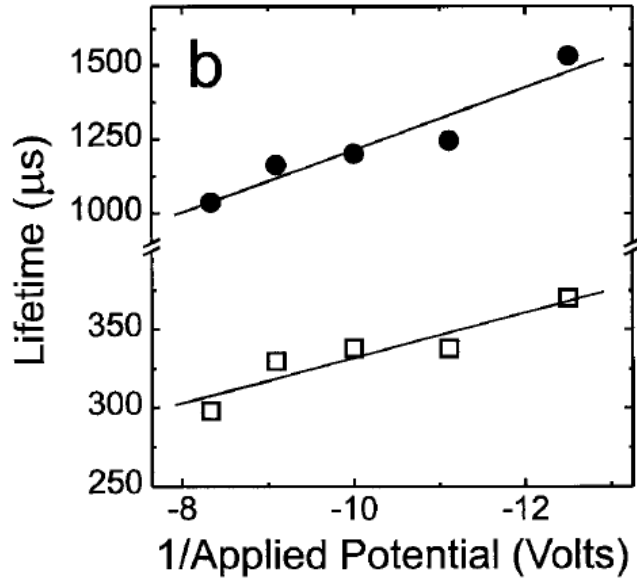


FIGURE 2.10 – Résultats expérimentaux de Kasianowicz *et al* [11] pour le temps de résidence de poly[U]₂₁₅ dans le nanopore d’ α -hémolysine en fonction de l’inverse du voltage appliqué. Les deux populations de temps de résidence (cercles pleins ou carrés vides) sont attribuées à deux orientations différentes de la molécule dans le pore.

Écoulement électroosmotique

Le champ électrique peut également influencer sur le passage des molécules en générant un écoulement net de liquide à travers le pore, appelé “écoulement électroosmotique” (*electroosmotic flow ou EOF*) (fig. 2.11). Cet écoulement peut en particulier agir sur le transport de molécules électriquement neutres [108].

L'écoulement électroosmotique contient deux contributions : la sélectivité du pore et la solvation des ions qui circulent dans le pore. La sélectivité du pore traduit, quand elle existe, une asymétrie dans le transport des cations et des anions à travers le pore sous l'effet du champ électrique. Si les anions traversent plus facilement le pore que les cations, le pore est sélectif aux anions. Dans le cas inverse il est sélectif aux cations. La sélectivité apparaît lorsque les parois du pores sont chargées, attirant les ions d'un certain signe et repoussant les autres. Un écoulement net *d'ions* à travers le pore apparaît alors sous l'effet du champ électrique. L'écoulement net de *liquide* (ions + solvant) est obtenu en tenant compte de la solvation des ions, c'est-à-dire la quantité de solvant transporté par chaque ion traversant le pore. Lorsque le solvant est l'eau, on parle de l'hydratation des ions.

Lorsque la distance au-delà de laquelle les interactions électriques sont écrantées (longueur de Debye) est petite devant le diamètre du pore, la circulation, sous l'effet du champ électrique, de la couche d'ions attirés par les parois chargées du pore entraîne le liquide alentour, provoquant un "écoulement-bouchon" dans le pore dont la vitesse caractéristique est [129] :

$$|v_{EOF}| = \left| \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} E \right| = \left| \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} \frac{V}{l_{pore}} \right| \quad (2.16)$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide ; ϵ et η sont respectivement la constante diélectrique et la viscosité de la solution ; ζ est le zeta-potentiel du pore, lié à la charge des parois du pore ; E est le champ électrique dans le pore généré par l'application du voltage V à travers le pore de longueur l_{pore} .

Le rôle de l'écoulement électroosmotique a été essentiellement mis en évidence dans les nanopores solides, dont les surfaces peuvent être très

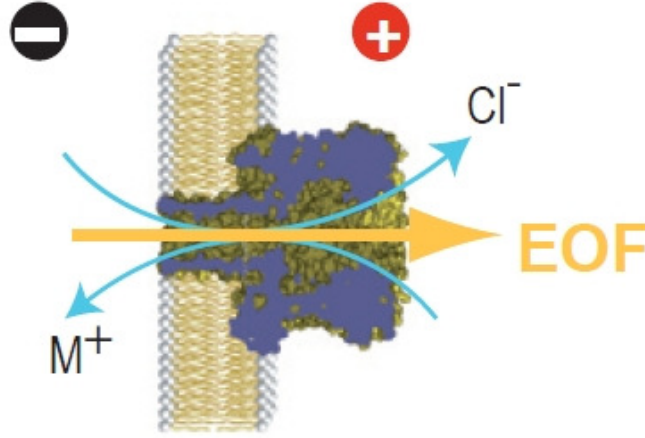


FIGURE 2.11 – Schéma de l'écoulement électroosmotique (EOF) à travers le nanopore d'α-hémolysine. Dans les conditions expérimentales standard le pore est sélectif aux anions [77, 78, 79]. Si les cations et les anions entraînent avec eux les mêmes quantités de solvant (comme dans le cas de K^+ et Cl^- [128]), l'EOF est orienté dans le sens de transport des anions.

chargées. Par exemple l'effet d'un écoulement électroosmotique a été évoqué pour décrire le transport de protéines dans un nanopore solide [130] ou pour expliquer le ralentissement du transport de doubles chaînes d'ADN lorsque le diamètre du nanopore est réduit [131]. Pour un nanopore solide de longueur 5 nm percé dans une membrane de nitrure de silicium avec $|\zeta| = 10$ mV dans 1M KCl [130] et en considérant la solution comme de l'eau $\epsilon = 80$, $\eta = 10^{-3}$ Pa.s, on obtient par l'équation 2.16 une vitesse de l'écoulement électroosmotique dans le pore de 14 cm/s pour un voltage appliqué de 100 mV.

Dans les nanopores protéiques, un écoulement électroosmotique a été

considéré responsable de la dépendance en voltage de l'entrée et de la résidence de molécules électriquement neutres (beta-cyclodextrines) dans des nanopores mutants d' α -hémolysine [108]. Dans d'autres conditions expérimentales, comme pour le transport d'ADN simple brin [60] ou de polymères PEG [132] à travers l' α -hémolysine, la contribution de l'écoulement électroosmotique a été jugée négligeable.

2.3.2 Interaction molécule/pore

L'existence d'une interaction entre la molécule et le pore peut modifier significativement les propriétés de transport de la molécule. Une attraction entre la molécule et les parois du pore peut permettre de ralentir suffisamment le transport de la molécule à travers le pore. Une application possible est d'obtenir une vitesse de translocation permettant de lire en temps réel la séquence d'un brin d'ADN en translocation [80, 20]. Une attraction entre l'ADN simple brin et le nanopore d' α -hémolysine a été évoquée [133] pour expliquer les temps de résidence anormalement longs (de l'ordre de la milliseconde) observés dans l'expérience historique de Kasianowicz *et al* [11].

Des temps de résidence différents ont été observés lors du transport à travers l' α -hémolysine d'homopolymères d'ADN de même longueur mais de compositions différentes [89] (fig. 2.12). Ce résultat a été attribué à une interaction différente avec le pore selon la composition de la molécule [89], et a été confirmé par des simulations informatiques [98, 97]. Par ailleurs, une différence dans la fréquence d'entrée d'ADN simple brin dans le pore d' α -hémolysine a été observée selon que l'ADN entre dans le pore par son extrémité 5' ou 3' [11, 134] ou selon que l'ADN entre par le côté vestibule ou

par le côté tige du pore [46]. Une contribution possible à ce dernier résultat est une interaction électrostatique entre l'ADN et l'entrée du pore différente selon le côté d'entrée, due à l'asymétrie de la distribution de charges de l' α -hémolysine [46].

L'utilisation de pores d' α -hémolysine mutants a d'ailleurs montré que la modification de la distribution de charges dans le pore affectait la fréquence d'entrée d'ADN simple brin [60] ainsi que la fréquence d'entrée et le temps de résidence de peptides chargés positivement [50].

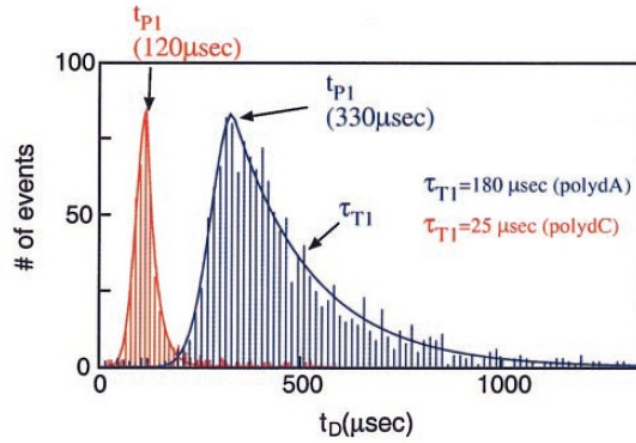


FIGURE 2.12 – Résultats expérimentaux de Meller *et al* [89] pour la distribution des temps de résidence de poly[dA]₁₀₀ (rouge) et poly[dC]₁₀₀ dans le nanopore d' α -hémolysine. Les différences observées sont interprétées comme résultant d'une interaction entre la molécule et le pore différente selon la composition de la molécule.

2.3.3 Longueur et conformation de la molécule

La dépendance de la fréquence d'entrée et du temps de résidence avec les dimensions de la molécule transportée a été l'objet de nombreuses études [11, 135, 88, 29, 84, 136, 121]. La compréhension du processus de capture peut

permettre d'utiliser les nanopores pour filtrer les molécules en fonction de leur taille [13]. La valeur du temps de résidence peut par ailleurs permettre de déterminer la longueur de la molécule [11, 135, 88].

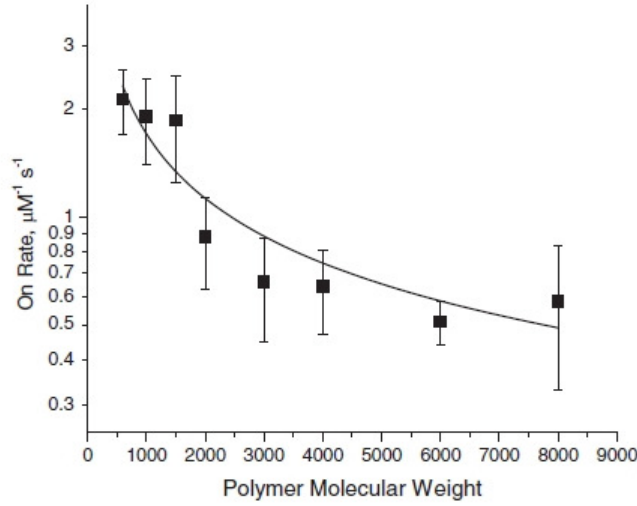


FIGURE 2.13 – Résultats expérimentaux de Krasilnikov *et al* [84] pour la fréquence d'entrée de polymères PEG dans le nanopore d' α -hémolysine en fonction de la masse du polymère, proportionnelle au nombre de monomères dans la molécule. Le comportement observé traduit un régime d'entrée diffusif.

La capture d'une molécule par un nanopore dépend fortement des dimensions de la molécule en solution par rapport à celles du pore (voir section 2.1.1).

Si les dimensions de la molécule en solution sont plus petites que le diamètre de l'entrée du pore, aucun effort de confinement n'est nécessaire pour faire entrer la molécule dans le pore. On est alors dans un régime d'entrée contrôlé par la diffusion des molécules depuis le compartiment initial, avec une zone

de capture plus ou moins étendue à l'entrée du pore. Dans ce cas la taille de la molécule n'influe que sur la vitesse à laquelle les molécules diffusent depuis le compartiment initial en direction de l'entrée du pore [84]. Les équations 2.2 et 2.7 prédisent une fréquence d'entrée f inversement proportionnelle au rayon r de la molécule si la molécule en solution a une forme globalement sphérique. En bon solvant le rayon de la molécule est relié au nombre N de sous-unités de la molécule par $r \sim N^{3/5}$ [99], d'où $f \sim N^{-3/5}$, vérifié expérimentalement [84] (fig. 2.13).

En revanche lorsque les dimensions de la molécule en solution sont supérieures au diamètre de l'entrée du pore, la perte d'entropie due au confinement résiste à l'entrée de la molécule dans le pore. Cette résistance peut créer une barrière d'énergie libre à franchir pour faire entrer la molécule dans le pore [46, 110, 24, 104]. Plus les dimensions de la molécule sont grandes devant le diamètre de l'entrée du pore, plus la barrière entropique d'entrée est grande. Le fait que le diamètre de l'entrée du vestibule du nanopore d' α -hémolysine soit supérieur au diamètre de l'entrée de la tige est, en plus des interactions électrostatiques, l'un des arguments utilisés pour expliquer que les molécules (ADN simple brin [46] ou polymères synthétiques [110]) entrent plus fréquemment dans le pore lorsqu'elles se présentent du côté vestibule plutôt que du côté tige. La conformation d'une molécule peut être modifiée pour lui permettre d'entrer plus facilement dans le pore. L'utilisation d'un agent dénaturant (chlorure de guanidium) a permis d'observer l'entrée de protéines (*maltose binding protein*) dépliées dans le pore d' α -hémolysine alors que les protéines n'entraient pas en configuration native [21].

Concernant la dynamique de la molécule dans le pore, le cas le plus simple est celui où le temps de résidence augmente linéairement avec la longueur de

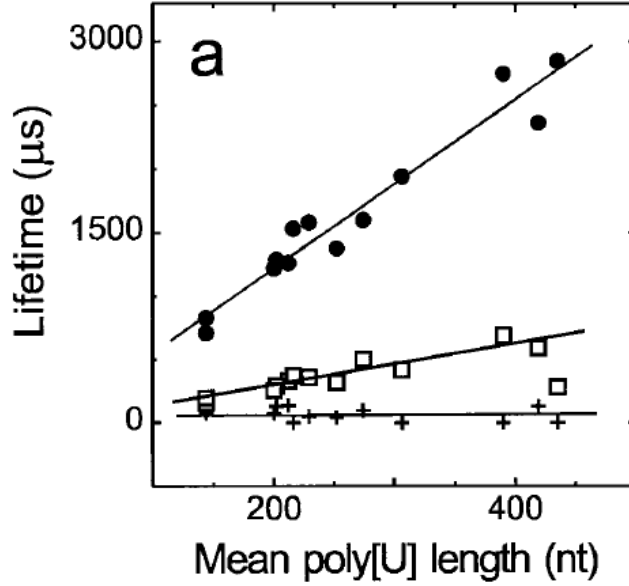


FIGURE 2.14 – Résultats expérimentaux de Kasianowicz *et al* [11] pour le temps de résidence de poly[U] dans le nanopore d' α -hémolysine en fonction du nombre de bases dans la molécule transportée. Les symboles (+) correspondent à des collisions de molécule avec l'entrée du pore, tandis que les deux autres populations (cercles pleins ou carrés vides) sont attribuées à des molécules transportées dans le pore avec deux orientations différentes.

la molécule [11] (fig. 2.14). Ceci peut correspondre à la translocation d'une molécule étirée dans le régime électrophorétique (voir section 2.1.2). Parfois le comportement linéaire n'apparaît que lorsque la molécule devient trop longue pour pouvoir être contenue dans le pore, tandis qu'un comportement différent est observé pour les courtes molécules. Ceci a été observé pour le passage d'ADN simple brin dans le pore d' α -hémolysine [29]. Le régime linéaire provient alors de la phase de transfert de la molécule à travers le

pore, durant laquelle la sortie de chaque monomère dans le compartiment final compense l'entrée simultanée de chaque monomère du côté initial, laissant la chaîne traverser le pore sous le seul effet du champ électrique (voir chapitre 4).

Un autre cas possible est celui d'une augmentation exponentielle du temps de résidence avec la longueur de la molécule. Ceci est habituellement interprété comme l'existence d'une barrière d'énergie libre proportionnelle à la longueur de la molécule, s'opposant au transport de la molécule à travers le pore [90, 91, 88, 84]. Un comportement non monotone a été observé pour le passage de polymères PEG dans l' α -hémolysine : le temps de résidence augmente d'abord exponentiellement avec la longueur de la molécule puis, au-delà d'une certaine longueur, le temps de résidence diminue [84] (fig. 2.15). Une interprétation possible est que l'énergie thermique des PEG courts leur permet de traverser le pore en franchissant la barrière d'énergie libre proportionnelle à leur taille qui s'y oppose, causant l'augmentation du temps de résidence avec la longueur du PEG ; au-delà d'une certaine longueur de PEG la barrière devient trop haute pour être franchie, essentiellement à cause du coût entropique de confinement, et les molécules ressortent rapidement du pore après y être partiellement entrées, causant la diminution du temps de résidence [84].

En dehors des régimes cités ci-dessus, une grande variété de dépendance du temps de résidence τ_{res} avec le nombre N de sous-unités constituant la molécule a pu être observée, traduisant la grande sensibilité des résultats aux conditions expérimentales employées. Une revue des différents exposants α observés tels que $\tau_{res} \sim N^\alpha$ peut être trouvée dans la référence [125]. Citons simplement la relation $\tau_{res} \sim N^{1.27}$ observée pour le transport d'ADN double brin dans un nanopore solide SiO_2 de 10 nm de diamètre [137], interprétée

comme résultant des interactions hydrodynamiques au sein des portions d'ADN à l'extérieur du pore [137], ou bien la transition entre $\tau_{res} \sim N^{1.4}$ et $\tau_{res} \sim N^{2.3}$ observée en fonction de la longueur de l'ADN double brin transporté à travers un nanopore solide SiN de 4 nm de diamètre [117].

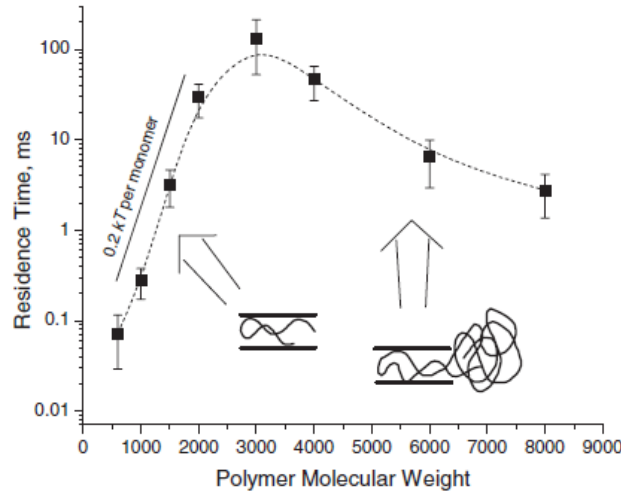


FIGURE 2.15 – Résultats expérimentaux de Krasilnikov *et al* [84] pour le temps de résidence de polymères PEG dans le nanopore d' α -hémolysine en fonction de la masse du polymère, proportionnelle au nombre de monomères dans la molécule. Le temps de résidence augmente d'abord avec la longueur du polymère avant de diminuer au-delà d'un certain seuil.

2.3.4 Autres

L'effet d'autres paramètres que ceux cités ci-dessus a également été testé. On peut citer l'effet de la concentration en molécules [92], de la concentration en ions [43, 85], du pH [81] ou de la viscosité [138] de la solution, de la température du système [89]. La variation de ces paramètres peut bien

sûr interagir avec les grands effets décrits dans la section précédente. Par exemple l'augmentation de la concentration en ions réduit la portée des interactions électrostatiques éventuelles entre la molécule et le pore en écrantant les charges, et l'augmentation de la température du système fournit une plus grande énergie thermique aux molécules pour franchir d'éventuelles barrières d'énergie libres.

Par ailleurs une asymétrie de la concentration en ions [105], du pH [132] ou de la température [139] entre les deux compartiments reliés par le nanopore peut être à l'origine d'une force supplémentaire facilitant ou s'opposant au passage des molécules.

Chapitre 3

L'électroosmose à travers le nanopore d' α -hémolysine dépend du type de cation alcalin en solution

L'existence d'un écoulement net de liquide (écoulement électroosmotique ou EOF, voir section 2.3) à travers un nanopore sous l'effet d'un champ électrique peut avoir un effet significatif sur la capture et le transport de macromolécules à travers le pore. Le rôle de l'EOF a été particulièrement mis en évidence dans les nanopores solides, dont les parois peuvent être très chargées, pour le transport de protéines [130] ou d'ADN [131]. Dans les nanopores protéiques, le rôle de l'EOF a parfois été invoqué [140, 108], et parfois négligé [60, 132], selon les conditions expérimentales. Gu *et al* [108] ont montré que l'EOF à travers des nanopores mutants d' α -hémolysine condi-

tionnait l'entrée et la résidence de molécules électriquement neutres (beta-cyclodextrines, β CD) dans le pore. En fonction de la mutation du pore, le sens et la force de l'EOF peut être contrôlé [108]. Cependant obtenir des pores mutants nécessite un travail lourd, qui rend intéressant de pouvoir contrôler l'EOF à l'aide d'un paramètre de l'expérience facilement ajustable.

Nous avons testé expérimentalement l'existence d'un EOF à travers le nanopore sauvage d' α -hémolysine dans une large gamme de voltage appliqué (± 30 à ± 150 mV) et de concentration en sel (0.6 à 4 M), pour deux sels différents : KCl et LiCl. Ce travail est décrit dans l'article [28] qui suit, soumis à *ACS Nano*.

Nous avons étudié par des méthodes standard d'électrophysiologie (voir chapitre 1) l'entrée et la résidence de molécules de beta-cyclodextrine (β CD) dans un pore unique d' α -hémolysine inséré dans une bicouche lipidique reconstituée. Les β CD entrent dans le pore par le côté tige mais ne peuvent traverser la constriction séparant le vestibule et la tige. La sortie des β CD se fait donc du côté tige par lequel elles sont entrées. Comme les β CD sont électriquement neutres, la dépendance observée en voltage de la fréquence d'entrée et du temps de résidence des molécules dans le pore est interprétée comme l'effet d'un EOF à travers l' α -hémolysine, en accord avec les résultats de Gu *et al* [108]. Cet EOF est dirigé dans le sens du transport des anions. Les fréquences d'entrée et les temps de résidence sont plus grands lorsque l'EOF favorise l'insertion des molécules dans le pore (EOF dirigé de la tige vers le vestibule) que lorsque l'EOF s'y oppose (EOF dirigé du vestibule vers la tige) (fig. 3.1). L'effet de l'EOF est d'autant plus fort que le voltage appliqué est grand. De façon intéressante, nous avons observé que l'EOF

était plus fort en présence de LiCl que de KCl.



FIGURE 3.1 – Schéma de l'écoulement électroosmotique à travers le nanopore d' α -hémolysine. L'EOF est orienté dans le sens du transport des anions. En fonction du signe du voltage appliqué, l'EOF peut aider l'insertion des β CD dans le pore (gauche) ou s'y opposer (droite).

Ces résultats ont été interprétés à l'aide d'un modèle théorique tenant compte de la sélectivité du pore et de la quantité d'eau transportée par les ions. Nous avons mesuré expérimentalement que l' α -hémolysine était plus sélective aux anions en présence de LiCl que de KCl. Cet effet est le principal responsable d'un EOF plus fort pour LiCl que pour KCl.

Nous avons testé l'effet de la concentration en sel sur la fréquence d'entrée et le temps de résidence. Quand la concentration en sel augmente, les charges des parois du pore, responsables de la sélectivité, sont plus écrantées et l'EOF diminue. Ainsi, quand l'EOF est dirigé contre l'insertion des β CD dans le pore, le temps de résidence augmente avec la concentration en sel. Cependant la fréquence d'entrée diminue avec l'augmentation de la concentration en sel, contrairement à ce qui est attendu quand l'EOF résiste à l'entrée des molécules dans le pore diminue. Il est possible que l'augmentation de la concentration en sel favorise la formation d'aggrégats de β CD en solution,

trop gros pour entrer dans le pore. Le nombre de β CD isolées disponibles pour entrer dans le pore diminuerait alors.

Bien que la plupart des comportements observés pour la fréquence d'entrée et le temps de résidence puissent être interprétés avec le seul effet d'un EOF à travers le nanopore d' α -hémolysine, certaines observations demeurent incomprises. Par exemple une transition apparaît dans la dépendance du temps de résidence avec le voltage négatif appliqué lorsque la concentration en LiCl augmente de 1 M à 4 M. Une inversion du sens de l'EOF avec l'augmentation de la concentration en sel ne permet pas de rendre compte de ce phénomène car aucune transition n'est observée dans les voltages positifs. Une hypothèse avancée est une modification structurale du pore d' α -hémolysine aux hautes concentrations en LiCl, qui permettrait alors aux β CD de traverser le pore lorsque l'EOF les y aide. De nouvelles expériences sont nécessaires pour répondre aux questions laissées en suspens.

Pour conclure nous avons montré l'existence d'un EOF dans le nanopore d' α -hémolysine, qui conditionne l'entrée et la résidence dans le pore de molécules électriquement neutres (β CD) dans une large gamme de voltage appliqué et de concentration en sel, LiCl ou KCl. L'EOF est orienté dans le même sens que le flot des anions, et peut aider ou résister au passage des molécules dans le pore en fonction du signe du voltage appliqué. La force de l'EOF dépend du voltage appliqué, de la concentration en sel et de la nature des ions utilisés. En particulier l'EOF dans l' α -hémolysine est plus fort en présence de LiCl que de KCl.

Electroosmosis through alpha-hemolysin depends on alkali cation type

Fabien Piguet,[†] Francoise Discala,[‡] Marie-France Breton,[‡] Juan Pelta,[¶] Laurent
Bacri,[¶] and Abdelghani Oukhaled^{*,‡}

*LPTM UMR 8089 CNRS, Cergy University, France, LAMBE UMR 8587 CNRS, Cergy University,
France, and LAMBE UMR 8587 CNRS, Évreux University, France*

E-mail: abdelghani.oukhaled@u-cergy.fr

Abstract

We demonstrate experimentally the existence of an electroosmotic flow (EOF) through the wild-type nanopore of α -hemolysin in a large range of applied voltage and salt concentration, for two different salts: LiCl and KCl. EOF controls the entry frequency and residence time of small neutral molecules (β -cyclodextrins, β CD) in the nanopore. The strength of EOF depends on the applied voltage, on the salt concentration and, interestingly, on the nature of the cations in solution. In particular EOF is stronger in presence of LiCl than KCl. We interpret our results with a simple theoretical model that takes into account the pore selectivity and the solvation of ions. A stronger EOF in presence of LiCl is found to originate essentially in a stronger anionic selectivity of the pore. Our work provides a new and easy way to control EOF in the nanopore of α -hemolysin, without resorting to the manipulation of the internal charge of the pore. In particular EOF can maintain a β CD molecule logged in the pore for a very long time (several

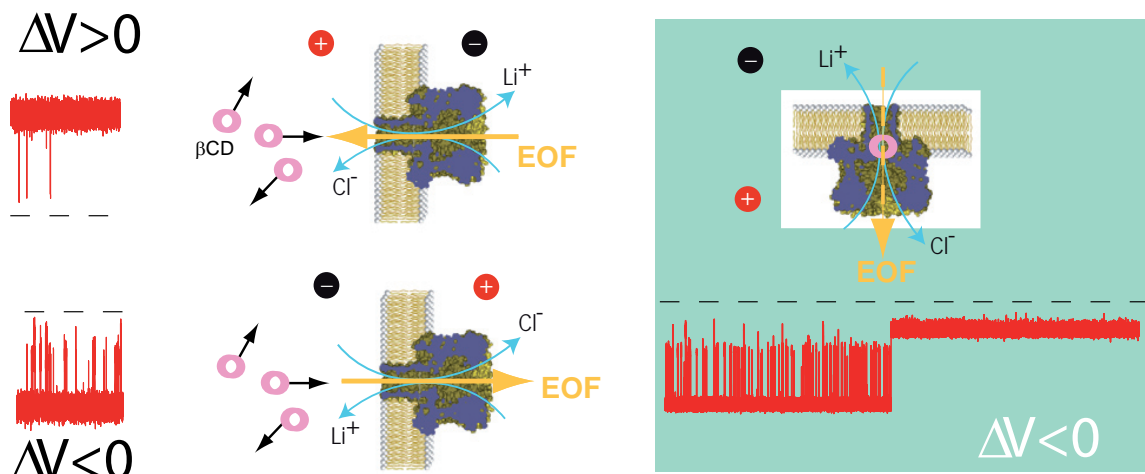
*To whom correspondence should be addressed

[†]LPTM UMR 8089 CNRS, Cergy University, France

[‡]LAMBE UMR 8587 CNRS, Cergy University, France

[¶]LAMBE UMR 8587 CNRS, Évreux University, France

minutes), which may be used as a molecular adapter for DNA sequencing and single-molecule spectrometry.



Keywords: nanopore, α -hemolysin, single molecule, electroosmotic flow, molecular adapter, lithium chloride, selectivity, solvation

Electroosmotic flow (EOF) is the movement of fluid through a capillary by the action of an electric field: it was reported by Reuss in 1809.¹ Electroosmosis is a timely subject in the nanopore translocation area. In nanotechnology and fundamental biological or physical problems at the single-molecule level, EOF involves in separations of DNA samples, chromosome isolation and in controlling the dynamics of transport of macromolecules through nanopore for fast sequencing of DNA or RNA,^{2,3} and single-molecule mass spectrometry.⁴⁻⁶ Both protein and solid-state nanopores are under investigation for probing the effect of EOF on the transport of small molecules, synthetic macromolecules, DNA, proteins and peptides.^{5,7-20} Experimentally, EOF can be controlled by the electrical field, the buffer composition, the thickness of the double layer, the control of surface charges, and the viscosity of the solution.^{12,13,16,17,21-24} In the case of transport of charged molecules through charged nanopores there is a combined action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis.¹⁶ The quantification of the different contributions is crucial for understanding transport phenomena. The situation becomes more complex with peptide and

protein through synthetic nanopores because of high surface energy of materials favoring adsorption.²⁵ Despite the complexity of the system, it was shown recently that EOF may strongly slow down the passing proteins or even reverse their apparent electrophoretic mobility.¹⁶ Therefore, EOF is an important parameter to take into account in solid-state nanopore translocation. In the case of biological nanopores, EOF is often neglected, the most popular argument being the low net charge of biological pores. Because of this idea, only few experimental studies have been devoted to electroosmosis through biological pores.^{7,8,10,26,27} Bayley and co-workers demonstrated by site-directed mutagenesis that EOF through mutant α -hemolysin pores may drive small neutral molecules (beta-cyclodextrins, β CD) into the pore.⁷ In contrast, it was demonstrated that through wild-type α -hemolysin nanopore EOF does not assist macromolecular translocations.^{5,8,9,28} Furthermore, in addition to the pore characteristics, the solvation of the ions in solution may contribute to EOF.^{9,29}

Bayley and co-workers have shown that cyclic sugar molecules (cyclodextrins, CD) of different sizes could be fixed in the α -hemolysin channel for a sufficiently long time at the molecular level (of the order of seconds) to reduce the size of the channel.³⁰ CD can thereby act as an adapter to adjust the molecular diameter of a miniaturized biological system and could be a good candidate for single-base DNA sequencing.^{30,31} However, without any bias, the CD insertion is random and transitory, and has an insufficient average lifetime in the α -hemolysin to complete the analysis of a DNA sequence with satisfactory statistics. To overcome this limitation, Bayley and co-workers have shown the possibility of producing chemical modification by site-directed mutagenesis to fix permanently a CD in the α -hemolysin nanopore.³² It turns out that this kind of chemical modification is difficult to perform and requires large resources. Here we propose a direct experimental evidence of EOF through the wild-type α -hemolysin nanopore without resorting to chemical modifications. In order to do so, we need to vary the physical parameters to determine the conditions for which the lifetime of the adapters bound to the α -hemolysin nanopore are the longest possible thanks to the control of the electro-osmotic flow in the direction of the adapter insertion into the α -hemolysin nanopore. A controlled EOF may also be used to enhance the capture of analytes by a

nanopore, thus reducing the minimal analyte concentration necessary to detect it at a practical rate. This is of particular interest when considering expensive analytes. Here β CD were introduced on the stem side of the α -hemolysin pore (trans side), in presence of a large range of KCl and LiCl salt concentration buffer and controlled by applied voltages. As β CD are electrically neutral, the voltage dependency of the entry frequency and residence time is interpreted as the effect of an EOF through the α -hemolysin. We observed that the magnitude of EOF is more significant in the presence of LiCl than of KCl because of the difference of pore selectivity and solvation of ions between the two salts. In all cases the net flow follows mainly the direction of anion (Cl^-). When a positive voltage is applied in the *trans* side, anions flow to the trans side. The neutral molecules (β CD) are repelled by the EOF, in proportion to the applied voltage, which is observed as a decrease of ionic current blockade frequency and residence times with the applied voltage. This decrease is more pronounced in the case of LiCl buffer than of KCl one. However, when a negative voltage is applied we observe an increase of blockade frequency and residence times with applied voltage, showing that β CD is driven by the EOF towards the channel. This increase is more pronounced in the presence of LiCl than in KCl, confirming our interpretation. Interestingly, close to the physiological conditions in LiCl salt concentration a potentially significant electroosmotic flow in the α -hemolysin is observed. EOF, in latter experimental conditions, could be used to unfold small peptide as demonstrated recently at 2M salt concentration and pH 3 very far from physiological conditions.¹⁰ The significant EOF in LiCl causes long blockades (several minutes) which occur only for negative voltage leading to extend the residence time of logged β CD in the pore without chemical modifications of the pore. These concomitant effects could be used for possible applications such as peptide sequencing in physiological conditions.

Materials and methods

Lipid bilayer is prepared using a classical method³³ and separates two compartments filled by a salt buffer. The α -hemolysin nanopore is inserted into this membrane.³⁴ Two Ag/AgCl electrodes

allow the control of the applied voltage and the measure of the ionic current.

The association and dissociation of small neutral cyclic polysaccharide (β CD, Mw=1135 g/mol) to the lumen of nanopore is detected by using electrophysiology experiments. The β CD molecules are introduced on the trans side of the membrane, the cis compartment corresponds to the one of the reference electrode (Figure 1a). In all experiments, the β CD concentration is 200 μ M. We explore a large range of applied positive and negative voltages of magnitude between 30 to 150 mV using a series of buffer solutions of M^+Cl^- (with $M^+ = K^+, Li^+$): 0.6, 1, 2, 3, and 4M, 5mM HEPES, pH=7.4. Single-channel ionic currents are recorded by an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Axon Instruments) in the whole-cell mode with a CV-203BU headstage. Data are acquired at 250 kHz with the DigiData 1440A digitizer coupled to the Clampex software (Axon instruments). The data are filtered using an 8-pole Bessel filter at a cut-off frequency of 10 kHz.

As our data treatment is based on a statistical analysis, we detect at least 2000 events, using a two-thresholds method; a first threshold th_1 is defined by the relation $th_1 = I_0 - 3\sigma$, where I_0 is the average baseline current (Figure 1d) and σ is the standard deviation of the open channel. In the histogram of the electric current (Figure 1d), one observes two populations separated by a well defined gap. The largest population (centered at I_0) is associated to the fluctuating baseline current. The second one (centered at I_b) is associated to the blockades caused by the β CD molecules (Figure 1c). As both peaks are well discriminated, the second discrimination threshold th_2 is determined by the average between I_0 and I_b $th_2 = (I_0 + I_b)/2$ where I_b being the mean blockades current caused by β CD molecules (Figure 1 c, d). The residence time of β CD molecules, the frequency, and the amplitude of the blockage are estimated statistically (Figure 1 e, f, g). In most cases, each value was averaged over three different single nanopore experiments.

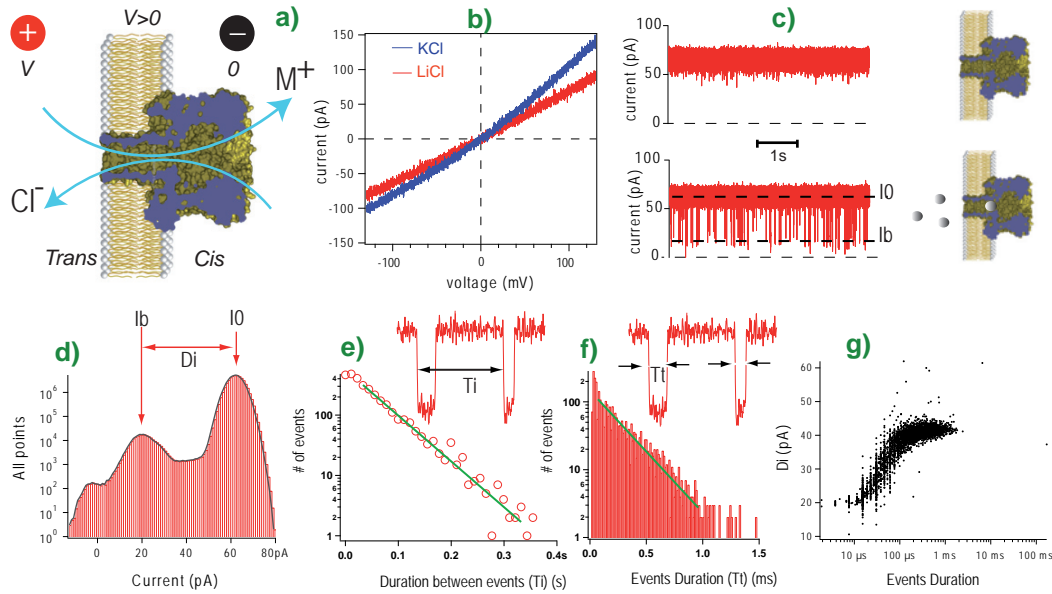


Figure 1: Experimental set-up and data analysis: (a) Principle of electrical detection method showing the ions flowing through a single α -hemolysin nanopore inserted in a lipid bilayer membrane according to the polarity sign. (b) I-V curves in presence of 1M KCl (blue curve) or 1M LiCl (red curve). (c) Typical current traces at 100 mV applied voltage, 1M LiCl, in absence (top) and in presence (down) of neutral molecules (β CD). (d) Current histogram of the current trace shown in (c) (down). The inter-event time T_i (e) and residence time T_i distributions (f) are shown on a log-linear plot calculated from the current trace shown in (c). The characteristic inter-event time (inverse of the event frequency) and residence time are estimated from a single-exponential fit of the corresponding distributions (green solid lines). (g) Corresponding scatter plot: blockade current variation (Di) as a function of its durations.

Results and discussion

We consider the case where the β CD are initially placed on the stem side of the α -hemolysin pore. In this case it has been shown^{30,35} that the β CD can enter the pore and bind inside the stem, near the constriction separating the stem and vestibule parts of the pore. The constriction is narrow enough that the β CD cannot cross it. After unbinding, the β CD escapes from the pore on the same side (stem side). The association-dissociation reaction between a β CD and α -hemolysin is shown in Figure 2a.

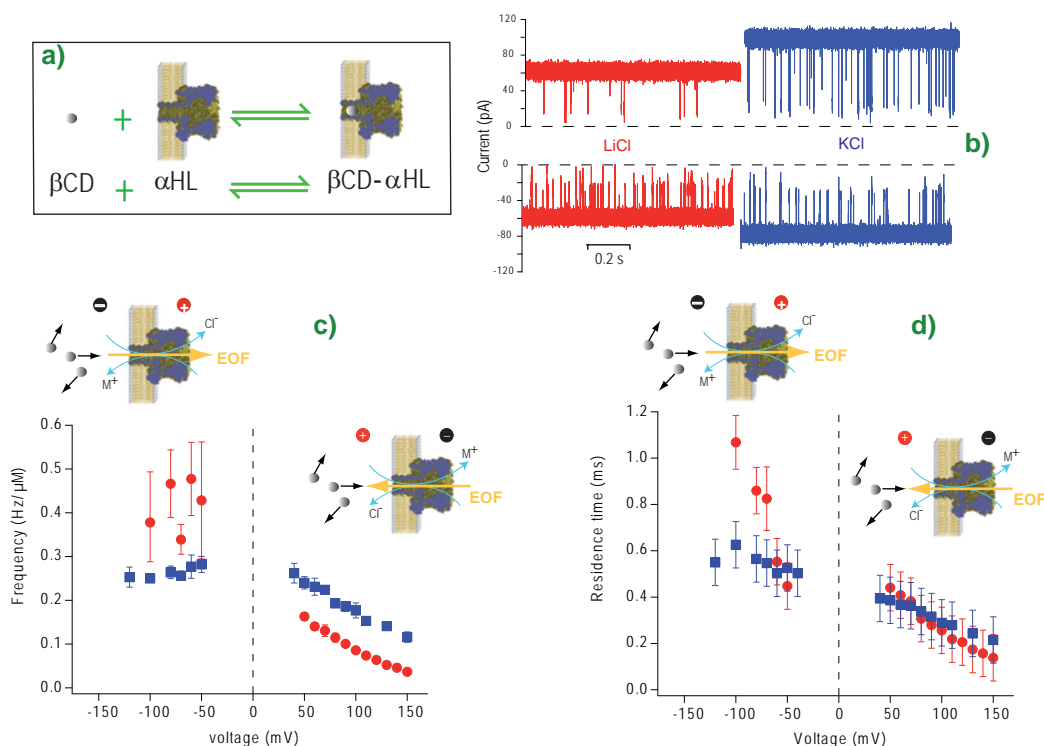


Figure 2: Experimental evidence of electroosmotic flow (EOF) through the α -hemolysin channel: (a) Cartoon showing the association-dissociation reaction between β CD and α -hemolysin. (b) Current traces recorded at positive voltage +100mV (top) and negative voltage -100 mV (down) in presence of β CD in the trans side (traces with low current level are performed in 1M LiCl (red), and those of high current level at 1M KCl (blue)). Plot of the event frequency (c) or residence time (d) of β CD in presence of 1M LiCl (red colored circles) or 1M KCl buffers (blue colored square) as a function of applied voltage.

In Figure 2b, we show the current trace in presence of β CD at positive (+100 mV) and negative

(-100mV) voltages by varying the salt nature. In what follows, we study in details the variation of the entry frequency and the residence time according to the applied voltage in 1M LiCl and KCl buffer solution (Figure 2c).

In 1M LiCl the entry frequency of β CD is always smaller for a positive applied voltage than for a negative voltage of same magnitude (Figure 2c). Furthermore the residence time is always shorter for a positive voltage than for a negative one (Figure 2d). In order to enter the pore, β CD molecules first diffuse from the *trans* chamber to a region near the pore entrance. Once then they begin to feel the effect of the EOF.^{7,36} For a positive voltage the EOF is directed from the *cis* (vestibule) to the *trans* (stem) side of the pore and repels the entry of β CD in the pore (see insets on Figure 2c and d). If a β CD achieves to enter the pore, the *cis-to-trans* EOF causes the rapid ejection of β CD from the pore, back to the *trans* chamber. For a negative voltage the EOF is reversed. In this case the EOF helps the entry of β CD in the pore. Once a β CD molecule is in the pore the *trans-to-cis* EOF maintains β CD lodged in the stem against the pore constriction. Very long blockade events (several minutes) occur only for negative voltage and have not been taken into account here.

The voltage dependence of the entry frequency and residence time is consistent with our EOF interpretation: when the positive voltage increases, both the entry frequency and the residence time of β CD decrease because the resisting EOF increases; inversely when the negative voltage increases in magnitude, the residence time increases because the helping EOF increases. In the negative voltage range, the entry frequency is more difficult to determine due to a greater pore instability and a worse signal/noise ratio. We observe no clear variation of the entry frequency with negative voltage. Our interpretation is that in that case the entry frequency is determined by the diffusion time of the β CD from the bulk to the pore entrance. Once a β CD molecule is close to the pore entrance, it is quickly pulled inside the pore, regardless of the negative voltage value.

If the entry frequency f is limited by the diffusion of β CD from the bulk, f reads:^{37,38}

$$f = 2\pi r_{pore} D_{\beta CD} C_{\beta CD} \quad (1)$$

where $r_{pore} = 1nm$ is the stem radius of the α -hemolysin pore; $D_{\beta CD} = 3 \times 10^{-10}m^2/s$ is the diffusion coefficient of a βCD molecule in the bulk;³⁹ $C_{\beta CD}$ is the concentration of βCD in the bulk. We estimate $f \approx 10^3Hz/\mu M$ which is about four orders of magnitude greater than the frequency we measure. It is possible that a significant number of the βCD in salt solution form aggregates. These aggregates cannot enter the pore, as the diameter of the α -hemolysin pore is only slightly larger than the dimensions of one βCD molecule. This would reduce the number of available solitary βCD in the bulk that may enter the pore. We shall discuss it further when considering the effect of salt concentration.

For 1M KCl the entry frequency and residence time exhibit the same qualitative behaviour as a function of voltage as in LiCl (Figure 2c, d). An EOF through α -hemolysin also exists in KCl solution. This EOF has the same qualitative voltage dependence as in LiCl. Nevertheless the variations of entry frequency and residence time when voltage is reversed are smaller for KCl than for LiCl. For positive voltages, where EOF resists the association of βCD with α -hemolysin, the entry frequencies and residence times are greater for KCl than for LiCl. However, for negative voltages, where EOF helps the association of βCD with α -hemolysin, the entry frequencies and residence times are smaller for KCl than for LiCl.

We propose a simple theoretical model to quantify the EOF effects through the α -hemolysin pore in our experimental conditions. This EOF is the origin of the net flow of liquid through the pore. Two factors contribute to the EOF: i) the selectivity of the pore, which compares the ionic current of cations and anions through the pore; ii) the number of solvent molecules transported by the cations and anions respectively.

The selectivity is quantified by evaluating the permeability ratio P_+/P_- , where the permeability P_i measures how easily ions i cross the pore (P_+ is the permeability of cations and P_- of anions). If the permeability ratio is less than unity the pore is anion-selective, otherwise the pore is cation-selective. The Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation is generally used to evaluate the

permeability ratio:⁴⁰

$$\frac{P_+}{P_-} = \frac{a(X^-)_{cis} - \exp\left(-\frac{eV_r}{k_B T}\right) a(X^-)_{trans}}{\exp\left(-\frac{eV_r}{k_B T}\right) a(M^+)_{cis} - a(M^+)_{trans}} \quad (2)$$

where V_r is the reversal voltage which sets the ionic current passing through the pore to zero; $a(X^-)$ and $a(M^+)$ are respectively the activities of anions and cations; e , k_B and T are respectively the elementary charge, the Boltzmann constant and the temperature.

In order to measure the reversal voltage V_r for the nanopore of α -hemolysin in presence of LiCl, we introduce different salt concentrations in *cis* and *trans* chambers: 1M on the *cis*-side and 0.2M on the *trans*-side. Agarose salt bridges containing 3M KCl are used between electrodes and buffer solution to ensure the stability of the electrodes. In this case we have to consider the existence of a liquid junction potential *LJP* on the interface between the salt bridge and the buffer solution, in both the *cis* and *trans* compartments.⁴¹ The V_r measured was corrected for the liquid junction potentials using the Junction Potential Calculator, which used the Henderson equation,⁴¹ supplied by the CLAMPEX 10.2 program. At $T = 25^\circ\text{C}$ we obtain $V_r = -26\text{mV}$, and thus a permeability ratio $P_+/P_-(\text{LiCl}) = 0.18$. This value is in agreement with previous experimental results⁴² performed in slightly lower pH conditions (pH between 6 and 7 *versus* 7.4 here). We test the validity of our result by using the same protocol to measure the permeability ratio in presence of KCl. We obtain $P_+/P_-(\text{KCl}) = 0.71$ which is also in agreement with previous experimental results.⁴³ Thus for both LiCl and KCl the anions cross the nanopore of α -hemolysin more easily than the cations, but the selectivity to anions is greater for LiCl. We note that considering the activities of the ions in solution instead of their concentration⁴¹ does not change the permeability ratios by more than 0.02.

From the permeability ratio one can estimate the number of water molecules flowing through the pore from the *cis* side to the *trans* side per unit time, J_w :⁴⁰

$$J_w = N_w \frac{I}{e} \left(\frac{1 - P_+/P_-}{1 + P_+/P_-} \right) \quad (3)$$

where N_w is the number of water molecules transported by an ion, assuming in a first approxima-

tion that this number is the same for a cation and for an anion; I is the ionic current flowing through the pore at a given voltage; e is the elementary charge. At 25°C and under an applied voltage of $+100\text{mV}$, typical values of the ionic current through α -hemolysin are $I=70\text{pA}$ for 1M LiCl and $I=100\text{pA}$ for 1M KCl (Figure 1b). Taking $N_w = 10$,^{40,44} we estimate $J_w(\text{LiCl}) = 3.0 \times 10^9$ water molecules per second and $J_w(\text{KCl}) = 1.1 \times 10^9$ water molecules per second. The water molecule flow is stronger for LiCl than for KCl , in agreement with our experimental observation. Note that, while considering an equal number of water molecules transported by a cation and by an anion is a valid approximation for KCl , this is less the case for LiCl where Li^+ tends to be more hydrated than Cl^- .⁴⁵ As Li^+ transports more water molecules than Cl^- , this would reduce the value of $J_w(\text{LiCl})$ calculated above which has the same direction as the anion current. Nevertheless, from our experimental results we observe that the difference of hydration between Li^+ and Cl^- does not compensate the strong anionic selectivity of the pore in presence of these ions: the EOF for LiCl is in the direction of the anion current, and is greater for LiCl than for KCl .

The estimation of the water flow J_w leads to the calculation of the electroosmotic velocity v_{EOF} , which reads:

$$v_{EOF} = \frac{J_w}{\pi r_{pore}^2 C_w} = \frac{J_w M_w}{\pi r_{pore}^2 \rho_w N_A} \quad (4)$$

where we consider the stem portion of α -hemolysin as a cylinder of radius r_{pore} containing C_w water molecules per unit volume; C_w is expressed in terms of the density of water ρ_w , the molar mass of water M_w and the Avogadro number N_A . Taking $r_{pore} = 1\text{nm}$, $\rho_w = 10^3\text{kg/m}^3$ for liquid water and $M_w = 18.10^{-3}\text{kg/mol}$, we obtain $v_{EOF}(\text{LiCl}) = 2.9\text{cm/s}$ and $v_{EOF}(\text{KCl}) = 1.1\text{cm/s}$.

As the effect of EOF in biological nanopore has usually been neglected,^{5,8,9,28} in contrast with the situation in solid-state nanopores whose walls are highly charged,¹⁶ it is of interest to compare the electroosmotic velocities we obtained in α -hemolysin to a typical electroosmotic velocity through a solid-state nanopore of dimensions comparable with the α -hemolysin channel. The electroos-

motoc velocity can be expressed as:⁴⁶

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \epsilon_0 \zeta}{\eta} E = \frac{\epsilon \epsilon_0 \zeta}{\eta} \frac{V}{l_{pore}} \quad (5)$$

where ϵ_0 is the permittivity of vacuum; ϵ and η are respectively the dielectric constant and the viscosity of the buffer solution; ζ is the zeta-potential of the nanopore; E is the electric field in the pore, which is expressed in terms of the applied voltage V and the length of the pore l_{pore} . We consider a SiN solid-state nanopore of length $l_{pore} = 5nm$ as the α -hemolysin stem, $\zeta = -10mV$ in 1M KCl;¹⁶ the buffer solution is assimiled to liquid water $\epsilon = 80$ and $\eta = 10^{-3}Pa.s$. Under an applied voltage of +100mV, we obtain a velocity magnitude $v_{EOF} = 14cm/s$. This value is only five times greater than the calculated electroosmotic velocity through α -hemolysin in presence of LiCl.

From the electroosmotic velocities evaluated in α -hemolysin, we can use equation 5 to estimate the charge density σ of the walls of the nanopore of α -hemolysin. As far as we know this estimation has not been performed previously. The zeta-potential ζ of the pore reads:

$$\zeta \cong \frac{\kappa^{-1} \sigma}{\epsilon \epsilon_0} \quad (6)$$

where κ^{-1} is the Debye length, above which the charges of the pore walls are screened by the ions in solution. Thus the electroosmotic velocity becomes:

$$v_{EOF} = \frac{\kappa^{-1} \sigma}{\eta} \frac{V}{l_{pore}} \implies \sigma = \frac{v_{EOF} \eta}{\kappa^{-1}} \frac{l_{pore}}{V} \quad (7)$$

In 1M LiCl we have estimated $v_{EOF} = 2.9cm/s$, taking $\eta = 10^{-3}Pa.s$, $\kappa^{-1} = 0.3nm$ and $l_{pore} = 5nm$ we obtain $\sigma = 4.8 \times 10^{-3}C/m^2$. We deduce the charge q of the stem of α -hemolysin that we consider as a cylinder:

$$q = \sigma 2\pi r_{pore} l_{pore} = 0.9 \text{ elementary charge} \quad (8)$$

This value is smaller than the expected net charge of α -hemolysin, which is of the order of several elementary charges ($-7e$ for the stem only, $+7e$ for the whole pore). The difference may come from the fact that the expression we use for the electroosmotic velocity is only valid when the Debye length is small compared to the pore diameter.⁴⁶ In our case the Debye length is equal to $0.3nm$ which is not negligible compared to the stem radius of α -hemolysin which is equal to $1nm$. Moreover, we can suppose that the water viscosity is higher in a confined medium than in bulk.¹⁰ Now, we focus on the movement of the β CD molecule in the nanopore of α -hemolysin. Considering that the residence of a β CD molecule in the pore corresponds to travelling from the stem extremity to the pore constrictions and then moving back to the stem extremity before escaping from the pore, one can read:

$$v_{\beta CD} \cong \frac{2l_{pore}}{\tau_{res}} \quad (9)$$

where $l_{pore} = 5nm$ is the length of the stem and τ_{res} is the residence time of the β CD molecule in the pore. At $+100mV$ and $1M$ salt concentration, we measured $\tau_{res}(LiCl) = 0.26ms$ and $\tau_{res}(KCl) = 0.29ms$ (see Figure 2d). Hence $v_{\beta CD}(LiCl) = 3.9 \times 10^{-3}cm/s$ and $v_{\beta CD}(KCl) = 3.5 \times 10^{-3}cm/s$. These values are 3 orders of magnitude smaller than the values of EOF velocities estimated from equation 4 in the same conditions. The movements of a β CD molecule in the pore result from a competition between thermal diffusion and EOF. On the one hand EOF is not overwhelmingly dominant because β CD achieve to enter the pore or escape from the pore against EOF. On the other hand diffusion is not overwhelmingly dominant because a voltage dependence is measured. We can estimate the thermal velocity of a β CD molecule in the pore:

$$v_{th} \cong \frac{D_{\beta CD}}{l_{pore}} \quad (10)$$

Taking $l_{pore} = 5nm$ and the diffusion coefficient of a β CD molecule equal to its bulk value $D_{\beta CD} = 3 \times 10^{-10}m^2/s$, we obtain $v_{th} = 6cm/s$. This value is roughly of the same order than the electroosmotic velocities we calculated for LiCl and KCl, as expected. Then, the apparent β CD velocity in the pore is much slower than both the thermal and EOF velocity. In the case of a positive voltage,

the main contribution to the residence time comes from the travel of the β CD molecule from the stem entrance to the pore constriction, during which EOF resists the progression. Then the travel from the pore constriction back to the stem entrance before escaping from the pore could be neglected due to the EOF helping. The situation is reversed in the case of a negative voltage, where the β CD molecule is quickly pulled from the stem entrance to the pore constriction by the helping EOF, and then take a longer time to escape against EOF on the same side it entered.

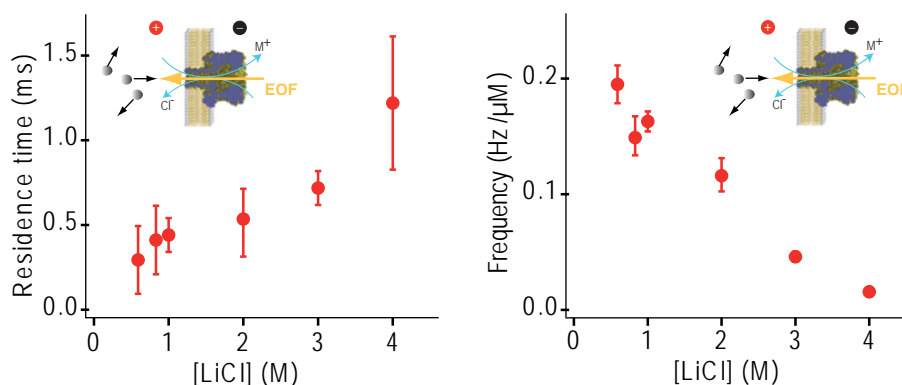


Figure 3: Effect of LiCl concentration on the residence time and event frequency. Residence time (left) and event frequency (right) as a function of LiCl salt concentration. Experiments were performed at constant applied voltage +50 mV.

We also investigate experimentally the effect of salt concentration (Figure 3). We measure the entry frequency and residence time at +50mV for different LiCl concentrations, ranging from 0.6M to 4M. The residence time increases when the LiCl concentration increases (Figure 3a). When the salt concentration increases, the charges of the pore walls are more screened. This reduces the pore selectivity and hence the EOF. As for positive voltages the EOF resists the association of β CD with the pore, the reduction of EOF leads to larger residence times. Thus one would expect the entry frequency at fixed applied voltage (+50mV) to increase with LiCl salt concentration. Surprisingly, the entry frequency is found to decrease as the concentration increases (Figure 3b). We conclude that a phenomenon which varies more quickly than EOF with LiCl concentration is at the origin of the behaviour of the entry frequency with LiCl concentration. Our hypothesis is that the increase of salt concentration favours the self-aggregation of β CD in solution, which was already observed

at 1M concentration. Thus the increase in salt concentration would reduce the number of available single β CD present in the bulk chamber and which may enter the pore.

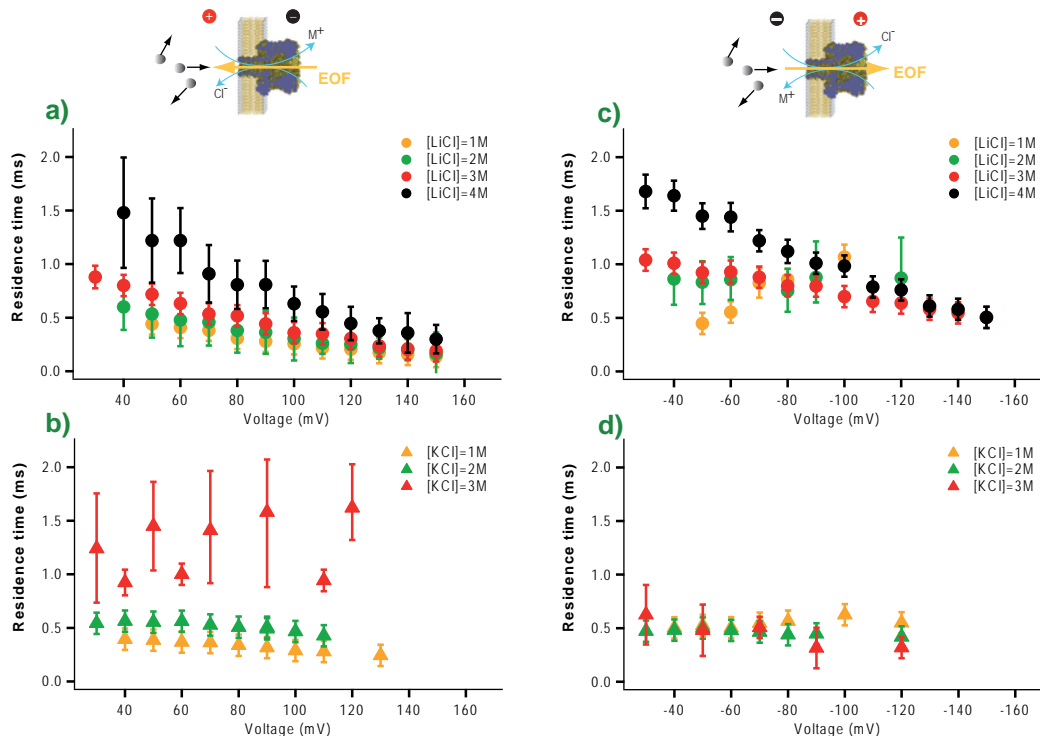


Figure 4: Effect of the applied voltage on the residence time of the neutral β CD molecules in different LiCl and KCl salt concentrations: residence time as a function of positive voltage (the β CD enter the pore against the EOF) in different LiCl (a) and KCl (c) salt concentrations. Residence time as a function of negative voltage (the EOF is in the same direction of β CD nanopore entry) in different LiCl (b) and KCl (d) concentrations.

We generalize our study and investigate the voltage dependence of entry frequency and residence time for different concentrations of LiCl (1M to 4M) and KCl (1M to 3M). Figure 4 shows the results for the residence time. For both LiCl and KCl, in the range of positive voltages, EOF is the dominant effect (Figure 4a and b): for any given salt concentration the residence time decreases when the positive voltage increases, due to a greater resisting EOF; for any given positive voltage the residence time increases when the salt concentration increases, due to a smaller resisting EOF. For a given salt concentration (1M, 2M or 3M), the residence times at positive voltages (the β CD enter the pore against the EOF) are longer for KCl than for LiCl. This confirms that EOF through

α -hemolysin is stronger for LiCl than for KCl in this range of salt concentrations.

In the range of negative voltages (the EOF is in the same direction of β CD nanopore entry) the behaviour of the residence time is more difficult to understand. For LiCl a transition occurs when the salt concentration increases (Figure 4c): while at 1M the residence time increases with the magnitude of the negative voltage, the voltage dependence becomes weaker at 2M and then the residence time decreases with voltage for higher salt concentrations (3M and 4M). The behaviour for 1M LiCl was explained above by the effect of EOF helping the association of β CD with α -hemolysin for negative voltages. At higher salt concentration, if the EOF was still the dominant effect, one would have expected shorter residence times and a weaker increase with voltage magnitude, as the helping EOF decreases. This is not the case and the origin of the observed behaviour remains an open question. One might think that the direction of the EOF is reversed when the salt concentration increases. EOF would be in the direction of the anion current at 1M LiCl, helping the association of β CD with α -hemolysin for negative voltages, and progressively reverse in the direction of the cation current as the salt concentration increases, hence becoming a resisting EOF. But this hypothesis is not consistent with the fact that no similar transition is observed for positive voltages. Another hypothesis is to imagine that the increase of salt concentration modifies the structure of the α -hemolysin channel. The behaviour of the residence time would be consistent with a wider opening of the pore constriction as the LiCl concentration increases. At 1M the constriction would be narrow enough to prevent β CD from crossing the pore, then the increase of the constriction diameter would progressively enable β CD to cross the pore for salt concentrations higher than 2M. In this case no transition would be expected in the range of positive voltages as the resisting EOF prevents β CD from crossing the pore regardless of the salt concentration.

When we use the KCl buffer instead of the LiCl one, at positive voltages, the behavior is the same except for the 3M concentration (Figure 4d). For KCl the residence times at negative voltages are smaller than for LiCl. The dependencies on voltage and salt concentration are weaker than in LiCl. We can roughly say that the residence time of β CD in the α -hemolysin pore in KCl solution for a negative applied voltage does not depend on voltage and KCl concentration. In KCl

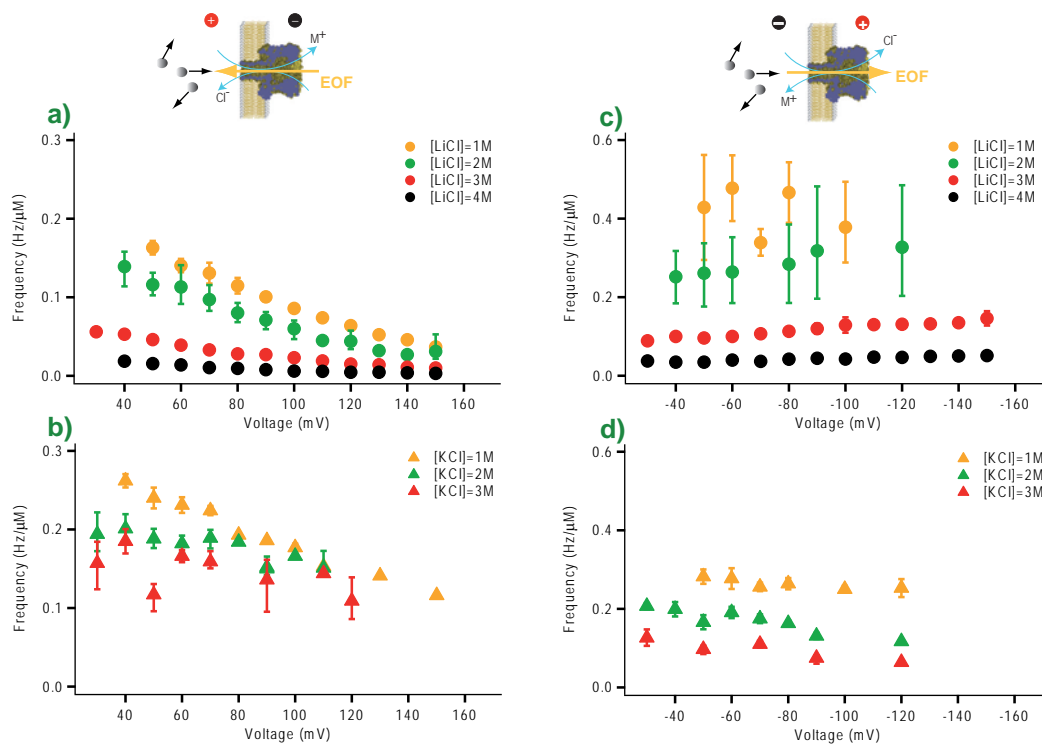


Figure 5: Effect of the applied voltage on the entry frequency of the neutral β CD molecules in different LiCl and KCl concentrations: entry frequency as a function of positive voltage in different LiCl (a) and KCl (c) concentrations (the β CD enter the pore against the EOF). Entry frequency as a function of negative voltage in different LiCl (b) and KCl (d) concentrations (the EOF is in the same direction of β CD nanopore entry).

also a transition occurs in the behaviour of the residence time. This transition is not of the same kind than the transition observed in LiCl for negative voltages. While in 1M KCl the residence times are greater for a negative voltage than for a positive one, which is consistent with the EOF interpretation, the contrary is observed in 3M KCl. The measurements performed during these experiments are really noisy with large error bars. This anomalous behaviour could be due to the formation of KCl aggregates, which may disturb our observations.

Now, we focus on the entry frequency as a function of voltage for different concentrations of LiCl (1M to 4M) and KCl (1M to 3M) (Figure 5).

In LiCl EOF dominates the voltage dependence of entry frequency in both the positive and negative voltage ranges (Figure 5a and b). For any given LiCl concentration, the entry frequency is greater for a negative voltage (helping EOF) than for a positive voltage of same magnitude (resisting EOF). The entry frequency decreases when the positive voltage increases, due to a greater resisting EOF, and increases when the negative voltage increases in magnitude, due to greater helping EOF. For both positive and negative voltages (figure 5a and c), the entry frequency decreases when LiCl concentration increases. As we observed at +50mV (see Figure 4b), the self-aggregation of β CD when the salt concentration increases may be responsible for the dependence of the entry frequency on salt concentration, regardless of the applied voltage. We do not observe any transition in the behaviour of entry frequency, by contrast with what has been observed for the residence time in the negative voltage range. This indicates that the phenomenon responsible for unexpected behaviour of the residence time with negative voltage is not important for the entry process.

In KCl also, for both positive and negative voltages (Figure 5b and d), the entry frequency decreases when salt concentration increases. As for LiCl, the self-aggregation of β CD may occur when KCl concentration increases. For a given KCl concentration, the positive voltage dependence of entry frequency is consistent with the effect of EOF. For negative voltages, the voltage dependence is weak at 1M, but then the entry frequency tends to decrease when the negative voltage increases in magnitude, on the contrary of what is expected from the action of EOF. In the same

time, while the entry frequency at 1M is greater for negative voltages than for positive ones, as expected from EOF, the contrary is observed at 3M. In the case of KCl both the entry frequency and residence time exhibit an unexpected behaviour in the negative voltage range when salt concentration increases above 2M.

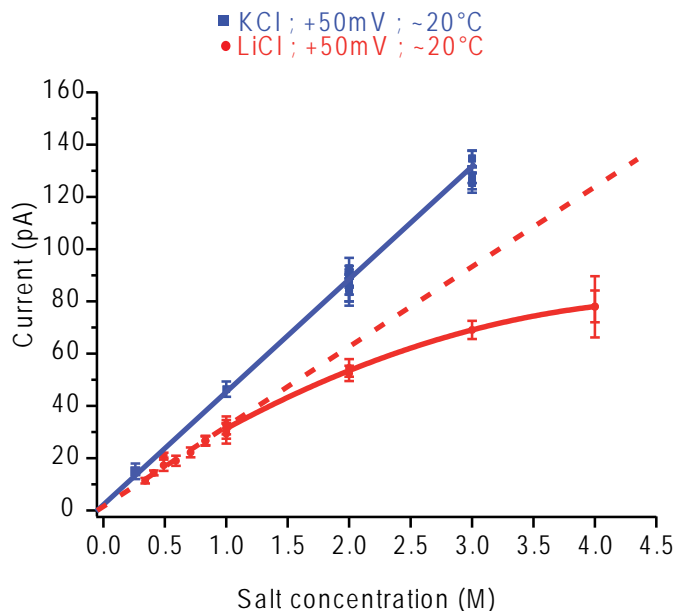


Figure 6: Open pore level of α -hemolysin nanopore at +50mV as a function of LiCl (red curve) and KCl (blue curve) salt concentration. Lines are drawn to guide the eye.

Interestingly differences between LiCl and KCl are also observed in the dependence of the conductance of the nanopore of α -hemolysin as a function of salt concentration (Figure 6). While a linear behaviour is observed for KCl in the concentration range (0.260 M to 3M), the conductance for LiCl deviates from a linear behaviour above 1M and seems to saturate at higher concentrations. It is possible that at high concentrations, LiCl ions bind to the nanopore walls thus reducing the apparent diameter of the pore and its conductance. This tendency has been revealed by molecular dynamics simulations⁴⁷ to be higher in the case of LiCl than KCl. If this phenomenon can be related to the unexpected behaviour of the entry frequency and residence time with voltage and salt concentration we observe for LiCl remains an open question.

Conclusion

In conclusion an electroosmotic flow (EOF) is shown to control the entry frequency and residence time of small neutral molecules (β CD) in the wild-type nanopore of α -hemolysin in a wide range of LiCl and KCl salt concentration (0.6 to 4M) and applied voltage (± 30 to ± 150 mV). In both salts the EOF follows the direction of the flow of anions. Depending of the voltage polarity, the EOF can either repel the β CD from the pore, decreasing both the entry frequency and residence time, or help the association of the β CD with the pore, increasing the entry frequency and residence time. The strength of the EOF depends on the voltage magnitude, on the salt concentration and, interestingly, on the nature of the cations in solution. In particular the EOF is stronger in presence of LiCl than KCl. This result has been interpreted by a simple theoretical model that consider the difference in pore selectivity and solvation of ions between LiCl and KCl. The larger anionic selectivity of α -hemolysin in presence of LiCl than KCl is found to be the major contribution to the difference of EOF strength between the two salts. Although the EOF interpretation allows to describe the larger part of our experimental results, some unexpected voltage dependencies have been observed for the entry frequency and residence time at high salt concentration. Further experiments would be necessary to understand the results obtained in these extreme salt conditions. Our work provides an easy way to control the strength of the EOF through the widely-used nanopore of α -hemolysin in standard experimental conditions, without chemical modifications of the pore. It would be interesting to probe this effect in other biological nanopores, such as aerolysine for exemple. The existence of long current blockades (several minutes) when the EOF is directed to favourise the association of β CD with α -hemolysin demonstrates that EOF can help the binding of a molecular adapter inside the nanopore and significantly increase the lifetime of the adapter bound to the pore. Furthermore the EOF may be used to unfold small peptides in physiological conditions, as demonstrated recently at 2M salt concentration and pH 3 very far from physiological conditions.¹⁰ The combination of maintaining a molecular adapter bound to the pore and unfolding an analyte could be used for sequencing applications. Finally reducing the pore diameter with a molecular adapter could be useful to enhance single molecule spectrometry.^{4-6,48}

References

- (1) Reuss, F. F. *Mémoires de la société des naturalistes de Moscou* **1809**, 2, 327–337.
- (2) Keyser, U. F.; Koeleman, B. N.; van Dorp, S.; Krapf, D.; Smeets, R. M. M.; Lemay, S. G.; Dekker, N. H.; Dekker, C. *Nat Phys* **2006**, 2, 473–477.
- (3) van Dorp, S.; Keyser, U. F.; Dekker, N. H.; Dekker, C.; Lemay, S. G. *Nat Phys* **2009**, 5, 347–351.
- (4) Robertson, J. W. F.; Rodrigues, C. G.; Stanford, V. M.; Robinson, K. A.; Krasilnikov, O. V.; Kasianowicz, J. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104, 8207–8211.
- (5) Reiner, J. E.; Kasianowicz, J. J.; Nablo, B. J.; Robertson, J. W. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, 107, 12080–12085.
- (6) Baaken, G.; Ankri, N.; Schuler, A.-K.; RĀijhe, J.; Behrends, J. C. *ACS Nano* **2011**, 5, 8080–8088.
- (7) Gu, L.-Q.; Cheley, S.; Bayley, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 15498–15503.
- (8) Wong, C. T. A.; Muthukumar, M. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, 133, 045101.
- (9) Breton, M. F.; Discala, F.; Bacri, L.; Foster, D.; Pelta, J.; Oukhaled, A. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, 4, 2202–2208.
- (10) Mereuta, L.; Roy, M.; Asandei, A.; Lee, J. K.; Park, Y.; Andricioaei, I.; Luchian, T. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 3885.
- (11) Sun, L.; Crooks, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 12340–12345.
- (12) Miller, S. A.; Young, V. Y.; Martin, C. R. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 12335–12342.

- (13) Miller, S. A.; Martin, C. R. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6226–6227, PMID: 15149208.
- (14) Vogel, R.; Anderson, W.; Eldridge, J.; Glossop, B.; Willmott, G. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 3125–3131.
- (15) German, S. R.; Luo, L.; White, H. S.; Mega, T. L. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 703–711.
- (16) Firnkes, M.; Pedone, D.; Knezevic, J.; Doblinger, M.; Rant, U. *Nano Letters* **2010**, *10*, 2162–2167, PMID: 20438117.
- (17) Yusko, E. C.; An, R.; Mayer, M. *ACS Nano* **2010**, *4*, 477–487, PMID: 20028119.
- (18) Luo, L.; Holden, D. A.; White, H. S. *ACS Nano* **2014**, *8*, 3023–3030.
- (19) Oukhaled, A.; Cressiot, B.; Bacri, L.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.-M.; Bourhis, E.; Jede, R.; Gierak, J.; Auvray, L.; Pelta, J. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3628–3638.
- (20) Oukhaled, A.; Bacri, L.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.-M.; Pelta, J. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7*, 1935–1949.
- (21) Brechtel, R.; Hohmann, W.; R  ijdiger, H.; W  d'tzig, H. *Journal of Chromatography A* **1995**, *716*, 97 – 105, 7th International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis.
- (22) Kuo, T.-C.; Sloan, L. A.; Sweedler, J. V.; Bohn, P. W. *Langmuir* **2001**, *17*, 6298–6303.
- (23) Polson, N. A.; Hayes, M. A. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1088–1092.
- (24) Wang, S.-C.; Perso, C. E.; Morris, M. D. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1704–1706.
- (25) Niedzwiecki, D. J.; Grazul, J.; Movileanu, L. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 10816–10822.
- (26) Rosenberg, P. A.; Finkelstein, A. *The Journal of General Physiology* **1978**, *72*, 341–350.

- (27) Levitt, D. G.; Elias, S. R.; Hautman, J. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1978**, *512*, 436 – 451.
- (28) Maglia, G.; Restrepo, M. R.; Mikhailova, E.; Bayley, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 19720–19725.
- (29) Rodrigues, C. G.; Machado, D. C.; da Silva, A. M.; Junior, J. J.; Krasilnikov, O. V. *Biophysical Journal* **2011**, *100*, 2929–2935.
- (30) Gu, L.-Q.; Braha, O.; Conlan, S.; Cheley, S.; Bayley, H. *Nature* **1999**, *398*, 686–690.
- (31) Astier, Y.; Braha, O.; Bayley, H. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1705–1710, PMID: 16448145.
- (32) Wu, H.-C.; Astier, Y.; Maglia, G.; Mikhailova, E.; Bayley, H. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 16142–16148.
- (33) Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. *The Journal of Physical Chemistry* **1963**, *67*, 534–535.
- (34) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 13770–13773.
- (35) Gu, L.-Q.; Bayley, H. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 1967 – 1975.
- (36) Muthukumar, M. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *132*, 195101.
- (37) von Smoluchowski, M. *Zeitschrift fur physikalische Chemie* **1917**, *92*, 129–168.
- (38) Berg, H.; Purcell, E. *Biophysical Journal* **1977**, *20*, 193 – 219.
- (39) Cameron, K. S.; Fielding, L. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 6891–6895, PMID: 11597206.
- (40) Hille, B. *Ionic channels of excitable membranes*; Sinauer Associates, 1992.

- (41) Barry, P.; Lynch, J. *The Journal of Membrane Biology* **1991**, *121*, 101–117.
- (42) Chakraborty, T.; Schmid, A.; Notermans, S.; Benz, R. *Infection and Immunity* **1990**, *58*, 2127–2132.
- (43) Mohammad, M. M.; Movileanu, L. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 8750–8759, PMID: 20540583.
- (44) Aksimentiev, A.; Schulten, K. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 3745–3761.
- (45) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*; Intermolecular and Surface Forces; Elsevier Science, 2010.
- (46) Bard, A.; Faulkner, L. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; Wiley, 2001.
- (47) Bhattacharya, S.; Muzard, J.; Payet, L.; MathÃ’l’, J.; Bockelmann, U.; Aksimentiev, A.; Viasnoff, V. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 4255–4264.
- (48) Balijepalli, A.; Ettedgui, J.; Cornio, A. T.; Robertson, J. W. F.; Cheung, K. P.; Kasianowicz, J. J.; Vaz, C. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1547–1553.

Chapitre 4

Translocation de polymères courts et longs à travers un pore interactif

À cause de l'asymétrie géométrique et électrique de l' α -hémolysine, la translocation à travers ce nanopore dépend du côté par lequel la macromolécule entre dans le pore. Il a été montré expérimentalement que des molécules d'ADN simple brin (chargées négativement) entrent plus fréquemment dans l' α -hémolysine lorsqu'elles se présentent du côté vestibule du pore que lorsqu'elles se présentent du côté tige [46]. Deux raisons peuvent expliquer ce résultat : le diamètre plus large de l'entrée du vestibule permet à l'ADN de rentrer plus facilement ; la charge négative de l'entrée de la tige repousse l'ADN chargé négativement, tandis que la charge positive de l'entrée du vestibule est attractive. D'autres expériences ont montré qu'une modification de la distribution de charges dans le pore d' α -hémolysine affecte significativement le transport d'ADN simple brin [60], de polypeptides [50]

ou de protéines [55] à travers le pore. En particulier la position de la modification de charge dans le pore joue un rôle crucial. Il est cependant difficile expérimentalement de découpler les effets dûs à l'asymétrie géométrique et à l'asymétrie d'interaction du pore. Le premier aspect du travail présenté dans ce chapitre a consisté à étudier par simulation informatique l'effet de la position de l'interaction sur la translocation de polymères dans un pore sans asymétrie géométrique.

Indépendamment des effets d'asymétrie du pore, l'influence de la longueur de la molécule à transloquer a aussi été étudiée expérimentalement. Le passage d'ADN simple brin de différentes longueurs à travers l' α -hémolysine a révélé l'existence de deux régimes dans la relation entre le temps de résidence et la longueur de l'ADN [29]. Le changement de comportement est observé lorsque l'ADN devient trop long pour être logé entièrement dans le pore. Dans le cas des longs brins, le temps de résidence augmente linéairement avec la longueur de l'ADN. Ce résultat a été reproduit par un modèle théorique [121] et des simulations informatiques [136]. Le régime linéaire des longs brins y est attribué à une contribution entropique supplémentaire venant de la portion d'ADN qui dépasse du pore pendant la translocation [136]. Cependant les modèles utilisés considèrent le pore d' α -hémolysine comme interagissant uniformément sur toute sa longueur avec la molécule qui le traverse. L'asymétrie du pore est donc ignorée alors que l'importance de la position de la zone d'interaction a été mise en évidence.

Nous avons réalisé des simulations informatiques de translocation pour étudier simultanément l'effet de la position de l'interaction molécule/pore et l'effet de la longueur de la molécule sur la translocation. Ce travail est décrit

dans l'article [31] qui suit, publié dans *The Journal of Chemical Physics* en 2013.

Comme dans de nombreux travaux de simulation antérieurs [97, 126, 141], notre système est limité à deux dimensions. Nous avons utilisé un modèle “à gros grain” qui contient les éléments principaux des expériences de translocation, sans chercher à reproduire les détails d’une expérience particulière. Nous ne prétendons pas faire de comparaison quantitative avec une expérience réelle donnée, nous cherchons plutôt à dégager des effets qualitatifs. Nous avons simulé la translocation d’un homopolymère à travers un pore rectangulaire. Le pore est étroit, le polymère ne peut le traverser qu’en étant étiré, les monomères se déplaçant en file indienne. Les parois du pore sont impénétrables et certaines portions de paroi peuvent être attractives pour le polymère. De plus dans le pore les monomères ressentent l’effet d’une force extérieure qui aide leur traversée. Cette force peut représenter l’action d’un champ électrique sur un polymère chargé ou l’entraînement par un flot électro-osmotique. Les valeurs des paramètres sont dans la gamme typiquement utilisée dans la littérature.

Nous avons testé l’entrée d’un polymère dans un pore dont seule une extrémité est attractive. Nous avons mesuré la probabilité que le polymère entre dans le pore dans le cas où il se présente à l’extrémité attractive du pore, et dans le cas où il se présente à l’autre extrémité. Naturellement nous avons observé que la probabilité d’entrée est plus grande du côté attractif. Cela montre qu’une interaction asymétrique entre le polymère et le pore, découplée de toute asymétrie géométrique du pore, est suffisante pour provoquer des différences dans la probabilité d’entrée. Nous avons observé que

la probabilité d'entrée ne dépend quasiment pas de la longueur du polymère, quel que soit le côté d'entrée.

Nous avons examiné le temps de résidence du polymère dans le pore en fonction de la longueur du polymère. Nous avons étudié trois positions d'interaction polymère/pore différentes : un pore uniformément attractif, un pore dont seule une extrémité est attractive dans le cas où le polymère se présente du côté attractif et le même pore dans le cas où le polymère se présente à l'autre extrémité. Avec nos valeurs de paramètres, la grande majorité des événements sont des translocations, c'est-à-dire que le polymère traverse le pore. Les quelques événements où le polymère ressort du pore du côté par lequel il est entré ne modifient pas les résultats et nous pouvons confondre temps de résidence et de translocation. Les temps de translocation sont plus longs dans le cas du pore uniformément attractif, ce qui est naturel puisque la zone d'attraction est plus grande. Quelle que soit la position de l'interaction, nous avons observé l'existence de deux régimes dans la relation entre le temps de translocation et la longueur du polymère. En accord avec les résultats expérimentaux, le temps de translocation augmente linéairement avec la longueur du polymère lorsque celui-ci est plus long que le pore. Pour trouver l'origine de cet effet, nous avons décomposé le temps de translocation en trois étapes : remplissage du pore, transfert à travers le pore et vidange du pore. Ceci révèle que le comportement linéaire dans le régime des longs polymères est dû au temps de transfert à travers le pore, quelle que soit la position de l'interaction. Pendant cette phase, chaque sortie d'un monomère du côté final s'accompagne de l'entrée d'un monomère du côté initial. Les contributions entropiques de confinement/déconfinement ainsi que les variations d'énergie d'interaction avec le pore sont ainsi an-

nulées, et le polymère circule dans le pore à vitesse constante sous l'effet de la force extérieure. Ceci remet en cause l'argument entropique utilisé précédemment [136].

À la vue de ces résultats, nous avons réexaminé les résultats expérimentaux de translocation de polymères PEG (poly(éthylène glycol)) de différentes longueurs dans l' α -hémolysine [88]. Bien que le PEG soit initialement neutre, il a été montré qu'il pouvait capter des cations en solution dans certaines conditions et ainsi se comporter comme un polymère chargé positivement [103]. Nous avons identifié le même changement de régime dans la relation entre le temps de résidence et la longueur du PEG, alors que les résultats avaient été interprétés précédemment avec un seul régime [88]. Le temps de résidence augmente linéairement pour des PEG contenant plus de 38 monomères, et ce pour chaque valeur de voltage utilisée dans l'expérience.

Enfin nous avons sondé la dynamique de translocation d'un polymère à travers un pore uniformément attractif. Nous avons sélectionné un événement de translocation dont la durée est proche de la durée la plus probable observée. Nous avons mesuré l'évolution temporelle du nombre de monomères dans le compartiment à l'entrée du pore, dans le pore et dans le compartiment à la sortie du pore. Malgré nos conditions de champ fort pour lesquelles la grande majorité des polymères qui entrent dans le pore parviennent à le traverser, la traversée ne se fait pas dans un mouvement continu. Au contraire il s'agit plutôt d'une succession d'avancées et de pauses, ce qui avait déjà été observé dans d'autres simulations [142, 143]. Les résultats suggèrent que lorsque peu de monomères sont dans le pore (juste après l'entrée des premiers monomères ou juste avant la sortie des derniers) la progression du

polymère est dominée par le mouvement collectif des monomères confinés dans le pore, et non par la force extérieure qui est alors trop faible. Ces monomères qui ne peuvent circuler qu'en file indienne doivent attendre que leurs voisins libèrent de l'espace pour pouvoir progresser, ce qui donne lieu à un mouvement collaboratif.

Pour conclure nous avons montré à l'aide de simulations informatiques l'importance de la position de l'interaction entre la molécule et le pore dans le processus de translocation. La fréquence d'entrée est naturellement favorisée lorsque l'entrée du pore est attractive. Les temps de résidence sont qualitativement et quantitativement modifiés par la position de l'interaction. Cependant, quelle que soit la position de l'interaction, on observe une augmentation linéaire du temps de résidence avec la longueur du polymère lorsque le polymère devient plus long que le pore. Ce phénomène a été identifié dans les résultats expérimentaux de translocation d'ADN simple brin et de polymères PEG dans le pore d' α -hémolysine. Nous avons identifié l'origine de ce comportement qui diffère des précédentes interprétations. Nous avons mis en évidence que lorsque la force agissant sur le polymère est faible, ce qui est le cas de nombreuses expériences de translocation, la progression du polymère est dominée par le mouvement collaboratif des monomères confinés dans le pore.

Translocation of short and long polymers through an interacting pore

F. Piguet and D. P. Foster^{a)}

Laboratoire de Physique Théorique et Modélisation (CNRS UMR 8089), Université de Cergy-Pontoise,
2 ave A. Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France

(Received 14 December 2012; accepted 6 February 2013; published online 28 February 2013)

We perform two-dimensional Langevin dynamics simulations of electric-field driven polymer translocation through an attractive nanopore. We investigate the effect of the location of the attractive region using different pore patterns. This is found to have an impact on both the translocation time as a function of the chain length and on the polymer entry frequency. We qualitatively compare our results to available experimental data. © 2013 American Institute of Physics. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4792716>]

I. INTRODUCTION

The passage of a molecule through a pore connecting two regions, known as translocation, is involved in many biological processes. Examples include the transport of RNA molecules through nuclear pores between the nucleus and the cytoplasm of the cell¹ and the insertion of proteins in the membrane of cell components.² Today it is also the basis of technological applications, such as using pores as sensors for fast molecule sequencing^{3–5} and as molecular sieves.⁶

In 1996, Kasianowicz *et al.*³ established what is today the standard experimental method for studying the translocation of a macromolecule through a nanopore. A system composed of two distinct volumes connected only by the pore is filled with an ionic solution. The macromolecules to be translocated (polymers in our case) are placed in one or both volumes. Applying an electrical voltage across the pore causes a stable ionic current to flow through it. The presence of a polymer inside the pore reduces the available volume for the flow of ions, causing the measured current to decrease. Measuring the time intervals between current blockades allows the determination of the frequency at which a polymer enters the pore. The duration of the blockade gives the time it spends inside.

Through the numerous studies devoted to polymer translocation, a variety of parameters have been shown to have a possible influence on the process depending on the conditions: If the pore diameter is smaller than the size of the polymer coil, the confinement of the polymer in the pore induces a loss of entropy which resists to its entry but helps its escape.^{7,8} An external force may be applied to drive the polymer through the pore. In the case of a charged polymer, the force results from the applied electric field.^{9–11} Such a driving force may also come from a difference of polymer concentration¹² or solvent quality^{13,14} between the two compartments connected by the pore. Depending on the charge of the pore walls, there might exist an electro-osmotic flow which can either help or resist the polymer translocation. This effect is expected to be an important effect in synthetic pores,^{15,16} which may be highly charged, but the relevance

to biological pores, such as α -hemolysin, is still debated.^{17–19} Since the electro-osmotic flow depends on the external-field strength, it is difficult to isolate the effect of electro-osmosis when translocating charged polymers in an external field. Finally the polymer may interact with the pore. This interaction contains at least a steric part which prevents the polymer from penetrating the pore walls.²⁰ In some cases specific repulsive or attractive interactions also exist between the polymer and the pore, which have been shown to have a great influence on the translocation process.^{20–23}

Here we use a simple two-dimensional model for the translocation of a charged polymer moving through an interacting channel. In this study we shall concentrate on the effect of an attractive interaction with the pore and the effect of the external field. The simplicity and the two-dimensional nature of our model prevents us from any direct comparison with experiments, our results do however exhibit common qualitative features with experimental data, which will be discussed below.

Translocation experiments use either biological or synthetic solid-state nanopores. The most commonly used biological pore is α -hemolysin.²⁴ This pore exhibits both a geometrical and electrical asymmetry. It consists of two pieces of roughly equal length (≈ 5 nm); a spacious vestibule connected to a narrower stem. In standard pH conditions the stem has a negatively charged ring at its outer extremity, while the rest of the pore is globally neutral.¹⁷ Henrickson *et al.*⁹ and Gibrat *et al.*²⁵ measured the entry frequency of negatively charged polymers (single-stranded DNA⁹ and dextran sulfate sodium²⁵) during translocation through α -hemolysin as a function of the applied voltage. They considered both the case where polymers enter the pore from the vestibule side and the case where they enter from the stem side. The blockade frequencies were found to be always greater on the vestibule side in the voltage range they explored. Two reasons were suggested to explain this result: First, the larger diameter of the vestibule entry reduces the loss of entropy necessary for the chain to enter the pore.^{9,25} Second, the negative extremity of the stem acts as a repulsive region for a negatively charged chain (while it would be an attractive region for a positive chain).⁹ These two mechanisms contribute to make entry of

^{a)}Electronic mail: damien.foster@u-cergy.fr.

negatively charged polymers easier from the vestibule side of α -hemolysin. While Henrickson *et al.*⁹ did not distinguish between these two contributions, Gibrat *et al.*²⁵ considered the easier entropic confinement to be mainly responsible for the greater polymer entry frequency on the vestibule side. Nevertheless, it has been shown experimentally that a modification of the charge distribution in the α -hemolysin pore dramatically affects the entry frequency of ssDNA.^{26–28} Such an effect has been observed regardless of which side the polymers enter, vestibule or stem side. The entry frequency was affected even when the charge was modified in a region of the pore that was not expected to influence chain insertion. The Debye length represents the distance over which an electrostatic interaction is thought to be screened by ions in solution.²⁹ Surprisingly it was found that a modification the charge located further than a Debye length from the pore entry still had a significant effect on the polymer entry frequency. It has been suggested that the head part of the polymer could explore the pore more quickly and deeply than previously thought before being sufficiently inserted to provoke a detectable current blockade.²⁶ In this paper we test the entry of a polymer into a pore with a symmetrical shape but an asymmetrical interacting pattern. We show that an asymmetrical interaction alone can lead to significant differences in the probability of chain entry. This probability depends on which side the polymer enters.

We also investigate the dependence of the polymer translocation time τ on the chain length N . Meller *et al.*¹⁰ performed the translocation of single-stranded DNA through α -hemolysin from the vestibule side. They identified two regimes in the chain length dependence of the translocation time, according to whether the polymer is sufficiently short to be accommodated as a whole inside the pore (stem) or not. In particular, they found that the mean translocation speed per monomer is constant for chains longer than the pore size. This observation was supported by a theoretical model based on the transport of the polymer through the free-energy landscape it experiences during the process³⁰ and by Langevin dynamics simulation.³¹ The model used contains the contributions of entropy and external driving force, as well as a polymer-pore interaction. The difference between the two regimes is attributed to an additional entropic contribution in the case of long chains from the portion of the chain that cannot be accommodated in the pore.³¹

Reiner *et al.*¹⁸ reported the translocation of poly(ethylene glycols) (PEG) polymers through α -hemolysin from the stem side. Whilst PEG is a neutral polymer, under certain circumstances it can coordinate cations in ionic solution and therefore behave like a positively charged chain.^{18,32–34} Reiner *et al.*¹⁸ considered these captured cations to be responsible for an attractive interaction between the PEG and the α -hemolysin pore. In contrast to Meller *et al.*,¹⁰ Reiner *et al.*¹⁸ described their results with a single free-energy barrier model, regardless of the chain length, short or long. They assumed the translocation time to be overwhelmingly dominated by the time it takes for the polymer to escape from the pore. The barrier the chain must overcome to escape results from the dominance of the pore attraction over the external driving force and the entropy gain due to deconfinement. Both the single-

and two-regime¹⁰ models mentioned above take the pore as fully interacting, ignoring the asymmetry of the pore. However, it has been shown experimentally^{26,27} and numerically³⁵ that the location of the interacting region can also have a great effect on the translocation time. In this paper we perform simulations in order to test the existence of a single regime or several regimes in the relation between the translocation time and the chain length. In particular we explore the effect of the position of the interacting region within the pore. We confirm that, whatever the pore pattern, a crossover exists in the N -dependence of τ . We reexamine the experimental data from Ref. 18 and identify the crossover. As already noted in Ref. 10, the transition distinguishes between short chains, where all monomers can reside together in the pore, and longer ones. Nevertheless, we do not use the entropic argument previously used by Matysiak *et al.*³¹ to explain the difference between the two regimes and propose our own interpretation.

The chronology of a translocation event gives us some further insight into the mechanisms at work. In particular, in addition to the contributions of entropy, external force and pore attraction, we highlight the importance of a crowding effect in the polymer chain. We show that the collective movement of the monomers, which must move together in a one direction for the chain to progress, plays a significant role when the external driving force acting on the chain is not too strong.

II. SIMULATION METHOD

The results presented here come from two-dimensional simulations performed using the ESPResSO simulation package.³⁶ The simulation system and the parameters values follow closely the work of Luo *et al.*²¹ and Cohen *et al.*³⁵

The polymer is modelled by a self-avoiding bead-spring chain, each bead representing a monomer. The excluded volume interaction between monomers is set by a purely repulsive truncated Lennard-Jones potential:

$$U_{mm}^{LJ}(r) = \begin{cases} 4\epsilon_{mm} \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] & \text{if } r \leq r_{mm}^c \\ U_{mm}^{LJ}(r_{mm}^c) & \text{if } r > r_{mm}^c \end{cases},$$

where r is the distance between consecutive monomers, ϵ_{mm} is the potential depth, and σ is the monomer diameter. The cut-off distance r_{mm}^c is set to the potential minimum to eliminate the attractive part, giving $r_{mm}^c = 2^{\frac{1}{6}}\sigma$. The chain connectivity is maintained by a FENE potential:

$$U^{FENE}(r) = -\frac{1}{2}kr_{max}^2 \ln \left[1 - \left(\frac{r}{r_{max}} \right)^2 \right],$$

where $k = 30\epsilon/\sigma^2$ is the spring stiffness and $r_{max} = 2\sigma$ the maximum distance between consecutive monomers. These parameter values lead to a mean bond length equal to σ . All the beads are identical and carry unit charge.

The pore and membrane walls consist of static beads separated from each other by a distance σ . The pore length is $L = 25\sigma$. The distance $D = 2.25\sigma \approx 2 \times 2^{\frac{1}{6}}\sigma$ between the centres of the wall beads ensures that there is a strong energetic penalty for any significant deviation of a monomer from

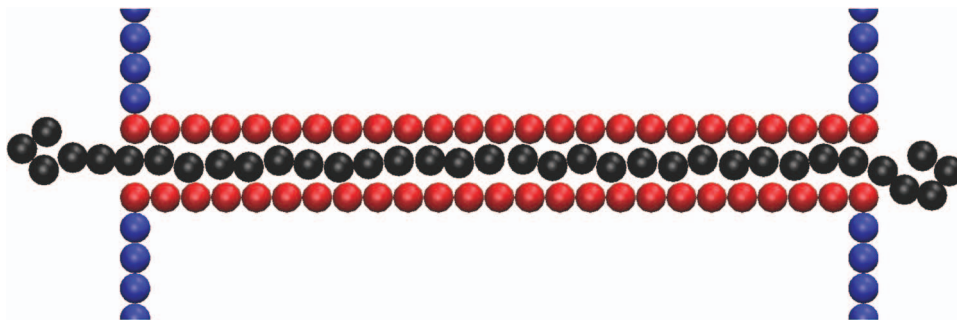


FIG. 1. A snapshot from the ESPResSO simulation, showing the single file transport of the polymer through the pore.

the central axis of the pore, ensuring single-file translocation (see Fig. 1 for snapshot). This restriction is not a problem, since the model may be considered to be a coarse grained version of the real polymer, and as long as the pore is narrow enough, the model monomers may be considered to be blobs in the de Gennes picture. We define two types of bead (A and B) which have different interactions with the polymer. All the beads in the membrane walls are of type A. The channel walls are symmetric about a median axis and can be made of beads of type A or B (Fig. 2).

The interaction between a monomer and a bead of type A or B is again described by a truncated LJ potential but with parameters $(\epsilon_{mA}, r_{mA}^c)$ and $(\epsilon_{mB}, r_{mB}^c)$, respectively. A type A bead acts as a purely repulsive site for a monomer; we set $\epsilon_{mA} = \epsilon_{mm}$ and $r_{mA}^c = r_{mm}^c$. A type B bead is an attractive site, thus we choose $\epsilon_{mB} = \epsilon_{mm}$ and $r_{mB}^c = 2.5\sigma$ to ensure the existence of an attractive part. Finally, each monomer inside the pore experiences a driving force f directed along the pore axis simulating the effect of the external electric field.

The equation of motion of a monomer i can be written:

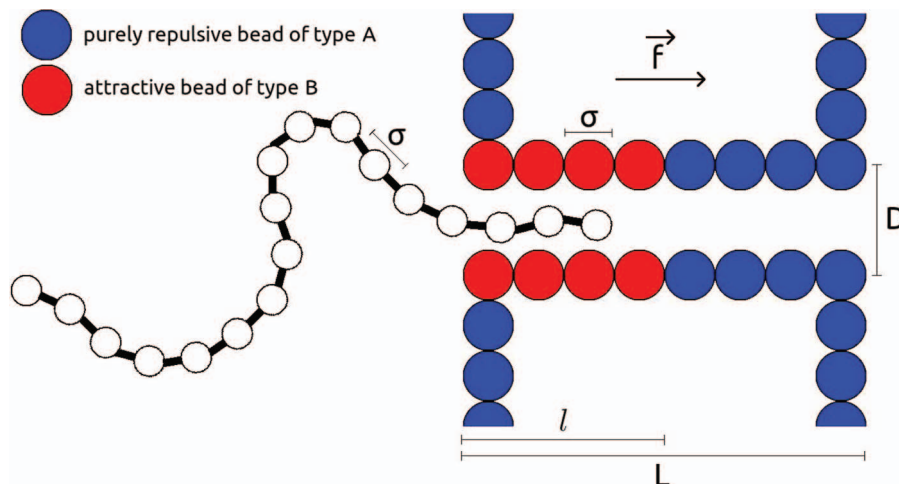
$$m\ddot{\vec{r}}_i = -\vec{\nabla}U_i + \vec{f} - \zeta\dot{\vec{r}}_i + \vec{\eta},$$

where m is the monomer mass, U_i is the sum of the interactions from the other monomers of the chain and from the wall beads on the monomer i , $\vec{\eta}$ is a random force mimicking the thermal agitation caused by collisions with the solvent molecules, and related to the friction coefficient ζ by the

fluctuation-dissipation theorem.³⁷ For $\vec{\eta}$, we use the Langevin thermostat provided by the simulation package to set the system temperature T .

Every run begins with an equilibration phase, during which one end of the polymer is fixed at the pore entrance while the rest of the chain is free to fluctuate. As we do not consider any hydrodynamic interactions, we take the time for the polymer to relax to equilibrium as the Rouse time $\tau_R \sim N^{1+2\nu}$.³⁸ The first bead is then released and the process is monitored. Each data point reported here results from averaging over 2000 independent simulations, at least in the region of interest.

In the molecular dynamics simulations all quantities are expressed in terms of an energy scale ϵ_{mm} , a length scale, σ , and a mass scale, m . In terms of these parameters, the time scale is defined by the time unit $t = (m\sigma^2/\epsilon_{mm})^{1/2}$. The temperature is given by $k_B T = 0.85\epsilon_{mm}$ and the frictional coefficient ζ is set to $0.7m/t$. The driving force on a monomer in the pore is set to $f = 1.0\epsilon_{mm}/\sigma$. The parameter values were chosen to be in the range typically used in the literature.^{21,35} It is difficult to relate the results directly to an experimental setup of a polymer with a particular voltage and charge per monomer, since the simulation groups different types of interaction together. For example an electro-osmotic flow within the pore would, at the level of our simulation, also appear like a charged polymer in a field. The interest of the simulations here are to gain some qualitative insight. However, if one were to take ϵ_{mm}

FIG. 2. A view of the simulation system in the case of a polymer entering on the attractive side of the pore. In this example the pore length is reduced to 8σ for sake of simplicity.

$= 35$ meV,³⁹ $\sigma = 0.35$ nm,⁴⁰ and $m = 44$ amu as the PEG monomer binding energy, length, and mass, respectively. We would have a temperature of about 20 °C and a force of about 13 pN per monomer in the pore.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Probability of entry

The frequency of blockade events depends on both the electric field and on which side the polymer enters from.^{9,25} The time between blockades may be broken down into three parts. The first is related to the time it takes a polymer to diffuse in the solution to the region of the pore entrance. For narrow pores, such as considered here, once the polymer has arrived near the pore, it must position itself such that one end is presented to the pore entrance before it can enter. The second part corresponds to the time for this to happen. Finally, for there to be a blockade, the polymer must overcome any free-energy barrier and enter the pore for a time long-enough for there to be a measurable drop in the current. This blockade event may or may not correspond to an actual translocation. The first step should not depend on the pore or the applied electric field. The second step could depend on the electric field strength, as the field is expected to extend weakly beyond the entrance of the pore,⁴¹ and is sensitive to hydrodynamic effects.^{42,43} However, one expects that only the third step depends on the detailed nature of the interior of the pore. The third step is the most amenable to simulation, and the first two steps are both independent of which side the pore enters. In what follows we concentrate on this third step.

In order to test the effect of an asymmetric interaction on the polymer entry frequency, each wall of the pore we use consists of an attractive part made of type B beads, on a length $l = 13$, completed by $L - l = 12$ purely repulsive type A beads. In the rest of this paper, when using this asymmetric pore, the pore side made of type B beads will be naturally referred to as the pore attractive side, while its other end will be referred to as the repulsive side, for the sake of simplicity.

The probability that the polymer enters the pore from an initial configuration with a monomer in the pore entrance has been extracted from our simulations for several chain lengths N and one value of the external force f , in both the case where the polymer initially faces the pore attractive side and the case where the polymer faces the pore repulsive side (Fig. 3(a)). It must be noted that in experiments a criterion is adopted to distinguish between current blockades due to the presence of a polymer in the pore and current variations due to the noise of the system. One or both of the following criteria are commonly used: the current drop must be sufficiently strong and/or its duration must be sufficiently long.¹⁸ These criteria in themselves cannot distinguish between polymers which translocate and polymers which exit from the side they entered. In order to perform an analysis comparable to what is done experimentally, we shall only consider that the polymer succeeds in entering the pore when it dwells more than a minimal time t_{min} inside the pore. We choose $t_{min} = 80t$ to obtain a selection criterion comparable with experiments of Reiner *et al.*¹⁸

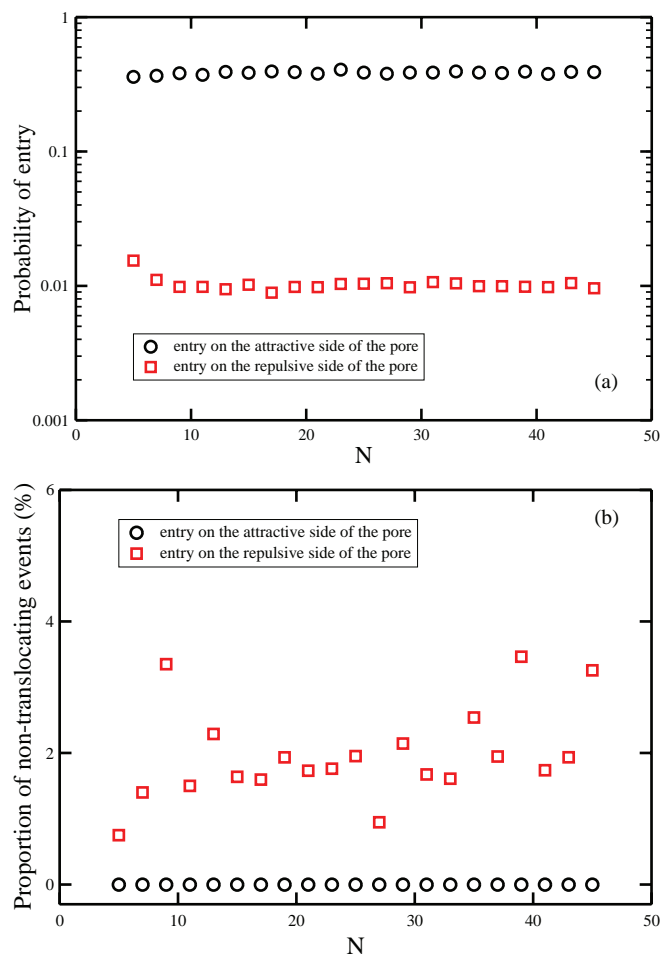


FIG. 3. The curves for both the probability and proportion of non-translocating events are shown for both sides probability of entry as a function of the polymer length. (a) Entry probability. (b) Proportion of polymers which fail to translocate.

Our results (Fig. 3(a)) show that, for each chain length, the probability of observing a current blockade is greater when the polymer is initially located near the pore attractive entrance rather than near the repulsive one. It is natural to expect that an attraction from the pore entrance facilitates chain insertion. These results demonstrate that the location of the polymer-pore interaction, decoupled from any geometrical asymmetry, is sufficient to cause great variations in the polymer entry frequency. Furthermore, in the range of chain lengths we explore, the probability of entry is roughly independent on the chain length, in agreement with results of Luo *et al.*⁴⁴ This reveals that the entropic cost to confine the first monomers and dwell more than t_{min} in the pore does not depend on the chain length in this range. It is also of interest to check the proportion of failed events (where the polymer exits from the pore on the same side it entered) in the total number of recorded current blockades as a function of the polymer entry side (Fig. 3(b)). It appears that, for the chosen value of t_{min} , all the events where the polymer entered on the pore attractive side are translocations. This is not the case on the repulsive entry side, although an overwhelming majority of events (more than 95%) are still translocations. It is likely that the proportion of failed events is involved in the nonmonotonic

behaviour of the residence time that has been experimentally observed for very long chains, as has been suggested.⁴⁵

B. Translocation time

The translocation process is divided into three steps: filling, transfer, and escape. To allow an easier comparison between the different pore patterns we use, the different stages are delimited by the position of the polymer relative to the pore interacting region. The *filling* stage (τ_1) begins with the entry of the first monomer into the pore and ends either when the interacting zone has been filled (long chain) or when the whole chain has entered this region (short chain). Then the *transfer* stage (τ_2) lasts until the chain end enters the interacting part of the pore (long chain) or until the head monomer reaches the exit of this region (short chain). Finally, the *escape* stage (τ_3) corresponds to the pore emptying.

1. Uniformly attractive pore

In order to highlight the main features of the translocation process, we first study the case of a pore whose walls are uniquely made of attractive beads. The mean translocation time τ and its components $\tau_{1,2,3}$ as a function of the chain length N are shown in Fig. 4(a). Because in this case the pore (length L) and its interacting part (length l) are equal, we shall refer to them both as *the pore*. Two regimes clearly appear for τ separated by a transition region corresponding to the pore size L , with a linear behaviour for $N > L$. The $\tau_{1,2,3}$ curves reveal that the first regime is dominated by the escape stage τ_3 (and filling stage τ_1 to a lesser extent), while the second regime is dominated by the transfer step τ_2 .

In order to enter the pore, the chain must experience a force sufficiently strong to counterbalance the loss of entropy due to confinement. This force is due to the external driving force and the pore attraction. The filling time τ_1 increases with N until $N = L$ because of an increasing number of beads to confine. All chains longer than L contain more monomers than the pore can accommodate. For all of these chains, the filling stage corresponds to the confinement of the same number of monomers, which is the maximum number of monomers the pore can accommodate. Thus the filling time τ_1 remains roughly constant for chains longer than the pore size. This reveals that, at least for long chains, the chain length does not play any significant role in the filling process which begins with one polymer end facing the pore entrance. In particular, it does not significantly affect the entropic cost to fill the pore.

During the transfer stage, the entropic and pore attraction contributions remain constant. This is obvious when the chain is sufficiently short to be accommodated as a whole in the pore. In this case, the transfer stage is just the transport of the chain inside the pore, from one end to the other. This begins when the tail end of the chain leaves the pore entrance and finishes when its head end reaches the front exit. An increase of the chain length reduces the distance it needs to cover inside the pore and increases the external force it feels, causing the transfer time τ_2 to decrease until $N = L$.

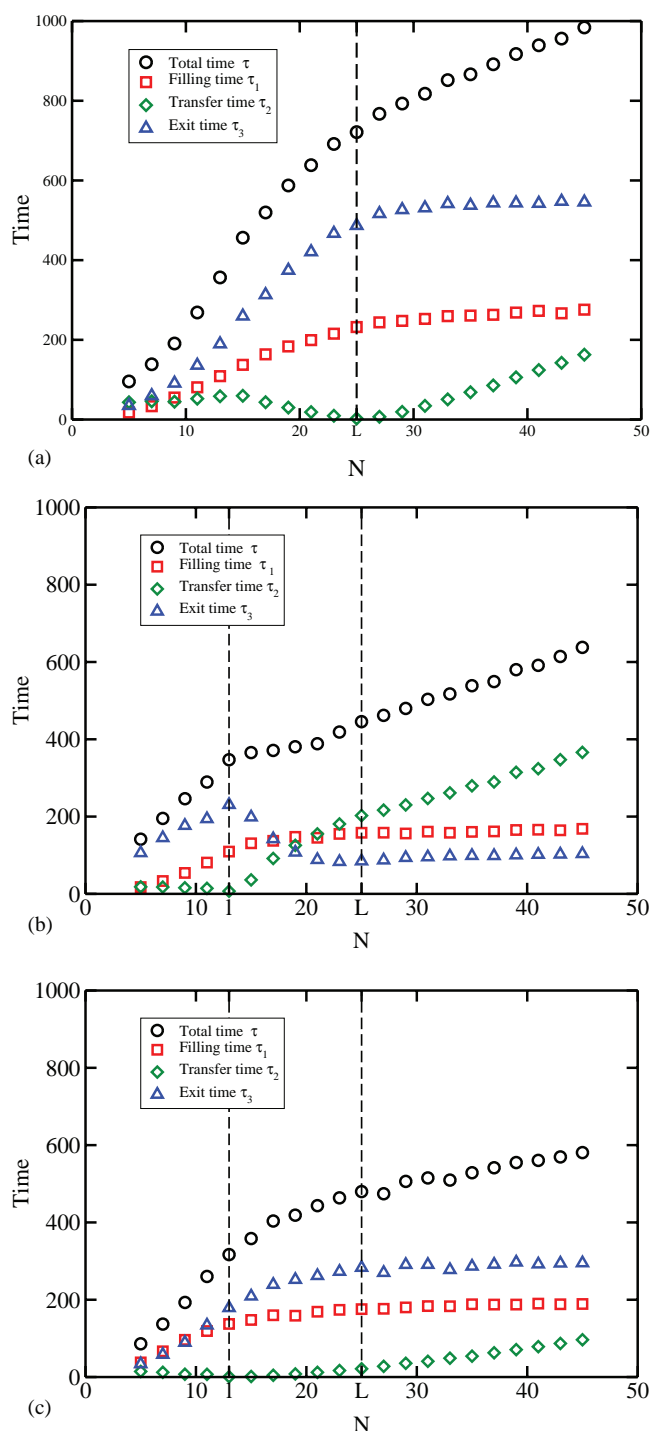


FIG. 4. Translocation time and its components versus chain length. (a) Uniformly attractive pore. (b) Pore with attractive section on side of polymer entry. (c) Pore with repulsive section on side of polymer entry.

For chains longer than the pore size, the transfer stage is the transport of the chain tail that has not been confined during the filling step. Constant entropic and pore attraction contributions result from the entry of a new monomer at one end of the pore is coincides with the exit of a monomer at the other end. This suggests that the entropic variation when confining/deconfining a monomer is roughly independent of the chain length outside the pore.⁴⁶ This is compatible with our observations in the range we consider. Thus a constant

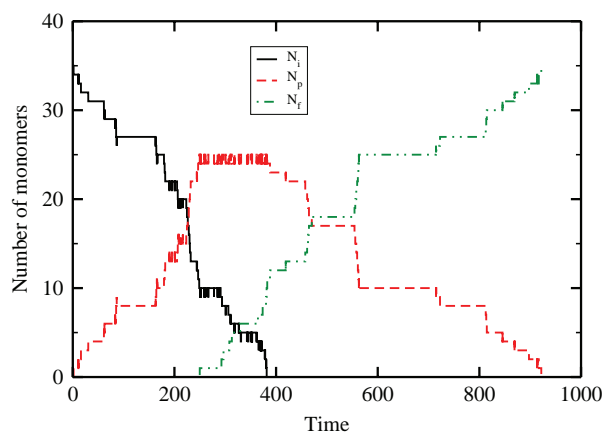


FIG. 5. Time evolution of the chain's position during a translocation event: N_i monomers have yet to enter the pore, N_p are inside the pore, and N_f have already translocated. The pore is uniformly attractive and the polymer length is $N = 35 > L$.

driving force, due to the action of the external force on a constant number of confined monomers, is equilibrated by the attraction from the pore walls and friction with the solvent. This leads to a constant speed of transfer, i.e., a linear increase of τ_2 with N .

The emptying stage τ_3 is similar to the filling one, except that now the gain of entropy due to deconfinement and the external driving force must overcome the pore attraction for the polymer to escape. As for the filling time, the escape time first increases as the number of monomers to release increases until $N = L$. Then, for longer chains, emptying a full pore requires roughly the same time, independently of the chain length.

Analysing the chronology of a translocation event gives us some further insight into the translocation process (Fig. 5). With our parameter values, the external force is sufficiently strong compared to the pore attraction to avoid the existence of any significant energy barrier. Adding the entropic contribution to obtain the polymer free energy could reveal a free-energy barrier in the filling stage, as it resists polymer confinement, but not in the emptying stage where it works with the electric field in helping the polymer escape. We find that considering an entropy cost of $k_B \ln \mu$ for the confinement of a monomer (where $\ln \mu$ is of order one) is not sufficient to create an entry barrier. The correction term for the polymer segment of N_{out} monomers yet to enter is $(\gamma - 1) \ln(N_{out})$ with $\gamma = 0.70$, chosen to take into account the presence of the membrane wall.⁴⁷ This correction would tend to make the entropy cost even smaller. It should be noted that these expressions for the entropic contribution may not be appropriate for two reasons: first they are scaling relations, valid for long chains, and second they assume that equilibrium conditions apply.

Whilst we have just shown that, with our parameters, no barrier exists in the pore emptying stage, and that it seems unlikely to find one in the filling stage, the translocations we recorded are not continuous drifts. On the contrary, we observe that, whatever the stage of the process, it consists of a stepwise stick-slip type motion (see Fig. 5). A similar observation was made in all atom molecular dynamics simulations^{48,49} During the filling stage, the number of beads

entering the pore in a single forward movement increases with time (from one to eight monomers at once). The longer the part of the chain inside the pore, the greater the external force it feels, while the entropic cost and energy gain from pore attraction when a new monomer is confined remain roughly constant. Then, as the chain progresses through the pore, the stronger external driving force allows larger groups of monomers to enter in one go. Despite this increasing driving force, the waiting time between two jumps to fill the pore first increases until the first eight monomers have entered, and then decreases. While the number of beads inside the pore is small, the external force acting on it is weak and the progress of the chain through the attractive channel is hindered by the fact that for one monomer to move forwards it must wait for the monomers ahead to move first (crowding effect). As the confined part of the chain increases, every new step requires a longer time since more monomers have to diffuse at the same time. Once a threshold number of monomers have been confined (≈ 8 in our example), the driving force acting on the polymer overcomes the crowding effect. The monomers ahead move fast enough to free space for those behind, allowing larger groups of beads to enter in shorter time intervals. This interpretation correlates with the observed inflexion of τ_1 in the $N < L$ regime: as the pore attraction dominates the progression of short chains ($N \lesssim 15$, Fig. 4(a)), confining every new bead takes an increasing time until the external force becomes the dominant effect, after which the mean entry time per new monomer decreases.

The same story, but in reverse order, describes the escape stage τ_3 . Now the driving force and the gain of entropy due to deconfinement act against the pore attraction. If the confined part of the chain is sufficiently long, the beginning of the emptying process is dominated by the driving force. After a threshold number of monomers have been released from the pore, the confined part of the chain is sufficiently short for the crowding effect to be dominant.

2. Influence of the location of the attractive region

We perform simulations in order to investigate the effect of an asymmetric interaction between the polymer and the pore on the translocation time. We consider the half-interacting pore we previously used, with an attractive region of length $l = 13$. We simulate both the case where the polymer initially faces the pore attractive side and the case where it faces the repulsive side (Figs. 4(b) and 4(c)).

Clearly the mean translocation time is shorter, since the attractive region is shorter. The interesting effect is the difference in behaviour depending on which end the polymer enters. When the polymer enters the attractive side, a new regime appears, for chain lengths comprised between the length of the interacting region (l) and pore size (L). With our parameter values, the translocation time stays nearly constant in this range. On both sides of this region, no qualitative change can be observed compared to the case of a uniform interaction.

Considering the τ_i components in the case where the polymer enters on the attractive side of the pore (Fig. 4(b)),

we first note that the filling time τ_1 now reaches a roughly constant value for chains longer than the length of the interacting part of the pore. This results from the definition of τ_1 , which corresponds to the filling of the pore interacting region. More spectacular changes concern the transfer and escape times. Between l and L , the curve of the transfer time τ_2 exhibits a new nonlinear part, while the escape time τ_3 decreases. These two results have the same origin. As the interacting region now covers only a part of the pore, a part of the chain can be located in a pore region where it feels the external force but not the pore attraction. When the polymer enters the pore on its attractive side, such a situation does not occur during the filling stage. During the transfer stage, the head portion of the chain that has already escaped from the attractive zone but not from the pore experiences an increasing driving force as it moves forward. This makes the confinement of every new bead easier and easier, leading to a decreasing mean additional transfer time per monomer for $l < N < L$. Similarly, the emptying stage for chains with $l < N < L$ is facilitated by the action of the external force on the head part of the chain, already outside the interacting zone but still inside the pore. This additional help, compared to chains with $N < l$, causes τ_3 to decrease. Globally, with our parameter values, the help provided by an extra bead interacting with the external force and not with the pore is such that the reduction of the escape time balances the additional transfer time. This leads to a nearly constant value of the translocation time for chain lengths between l and L . For chains longer than the pore length, once the first monomer has escaped from the pore, the number of monomers experiencing the external force remains constant. While the pore is full, the entropic and pore interaction contributions also remain constant. The transfer stage is thus completed by the linear transport of the end part of the chain which has not yet been confined and τ_2 increases linearly for $N > L$. Finally, because all the chains with $N > L$ must extract the same number of monomers from the pore in order to empty it, we observe once again a constant value for the escape time.

The results obtained when the polymer enters on the repulsive side of the half-interacting pore are shown in Fig. 4(c). Even if a region still exists where the external force acts on the monomers unbalanced by the pore attraction, all the curves exhibit a monotonic behaviour, in contrast with the previous case. The resulting extra force now contributes to the $\tau_{1,2}$ steps. The acceleration it provides when one monomer is added to the chain is not sufficient to balance the additional filling and transfer times endured.

If the total chain length did not have any significant impact on the chain progression once the chain is long enough, we would have expected τ_3 to be constant for $N > l$. This is not the case: τ_3 still increases above l , albeit more and more slowly reaching a constant asymptote. We conclude that the total chain length does have an influence here. We examine the converse situation, i.e., the entry stage on the pore attractive side (Fig. 4(b)). Even if the effect is smaller, τ_1 also shows a slightly increasing part above l . We deduce that the effect of the chain length is not entropic in nature, because it slows both the polymer entry and escape. It is rather a manifestation of the crowding effect between the monomers, which

dominates the chain progression at the beginning of the filling stage and at the end of the emptying stage. Our observation reveals that this crowding effect not only involves the confined monomers but also the monomers located near the pore entrance, whose movements are correlated with those of the inserted part of the chain. Monomers located further in the chain structure outside the pore, if they exist, are sufficiently decorrelated from those inside the pore to have a negligible influence on their movements. Hence the crowding effect saturates above a certain chain length.

3. Comparison with experiment

We must first recall that experimental data in Refs. 10 and 18 relate to the time the polymer spends inside the pore, and do not distinguish on which side the polymer escapes. The discussion above only dealt with translocation events. In this section we show our results for the dwell time as a function of chain length for all events where at least a portion of the chain resides more than a minimum time t_{min} inside the pore. Once again we chose $t_{min} = 80t$ so as to be consistent with the experimental criterion. The results for all events were quantitatively and qualitatively the same as before, reflecting the fact that we are in the strong field limit, and virtually all the polymers which enter the pore translocate. Thus in what follows we use the results shown on Fig. 4 to compare with experimental work.

Our results on the translocation of a charged polymer through an interacting pore are in good qualitative agreement with the experimental observations of Meller *et al.*¹⁰ on the transport of single-stranded DNA (4–100 bases) through α -hemolysin. The distribution of translocation times from our simulations (Fig. 6) is qualitatively similar with the experimental distribution reported in Ref. 10. This indicates that our choice of parameters is compatible with the conditions of the experiments we refer to. Meller *et al.*¹⁰ identify a crossover in the chain-length dependence of the translocation time for a strand length $N^* \approx 12$ DNA bases. The DNA bases translocate in single file, just as in our simulations. They also

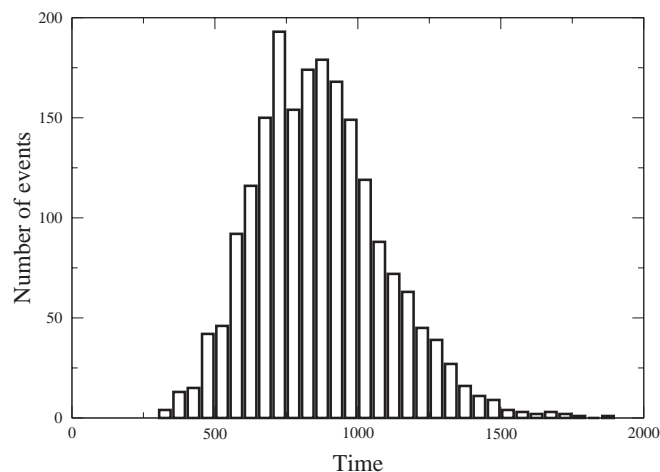


FIG. 6. A typical distribution of the translocation times from our simulations. The pore is uniformly attractive and the polymer length is $N = 35 > L$.

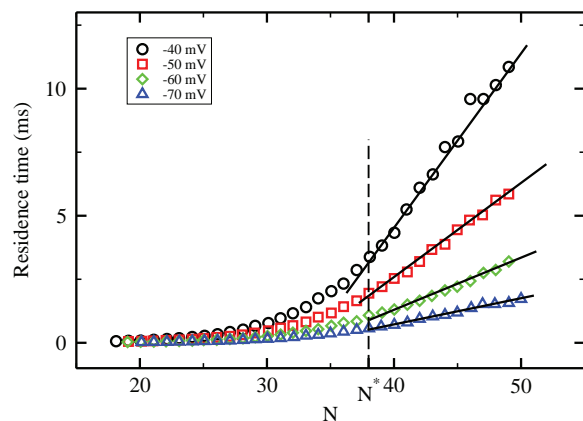


FIG. 7. Experimental results on PEG polymer residence time in α -hemolysin as a function of the polymer length taken from Figure 5 D in Reiner *et al.*¹⁸ The curves become linear beyond N^* , the solid straight lines are place to help guide the eye.

observe a crossover for the mean pore current as a function of the chain length at the same value of N^* . For longer chains, the translocation time increases linearly with the chain length, and the current attenuation remains constant at its minimal value. As the current through the pore decreases when the number of monomers inside the pore increases, this indicates that the crossover corresponds to the maximal chain length which can be accommodated in the pore and contributes to the current drop. But a value of 12 DNA bases corresponds to a linear chain length of 4.8 nm,¹⁰ i.e., only half of the α -hemolysin pore length. This suggests that the current drop is mainly due to the presence of a polymer in a limited region of the α -hemolysin pore. The duration of the current blockades corresponds to the transport of the polymer through this particular region. This region can accommodate a maximum of 12 DNA bases, and thus has a maximum length of roughly 5 nm considering the confined part of the chain as totally unfolded. While the two parts of the α -hemolysin pore (vestibule and stem) have roughly equal lengths of 5 nm, the narrowness of the stem part causes greater current drops in the presence of a polymer inside. Moreover molecular dynamics simulations have shown that the essential of the potential drop occurs through the stem part of α -hemolysin.⁵⁰ Thus we can reduce the translocation through α -hemolysin to the crossing of the stem channel, which is assimilated to the pore we used in simulations. Our simulation results confirm the experimental observation that a crossover occurs for the behaviour of the translocation time with the chain length when the chain becomes too long to be accommodated in the pore.

We also compare our conclusions to the experimental results of Reiner *et al.*¹⁸ on the translocation of PEG (19–50 monomers) through α -hemolysin (Fig. 7). These results were interpreted with a single-regime model, i.e., without a crossover in the polymer length.¹⁸ Reexamining their data in the light of our results, we identify the crossover between a nonlinear and a linear behaviour of the translocation time with the chain length for each voltage value (Fig. 7). This transition occurs for a polymer of length $N^* \approx 38$ PEG monomers. By contrast with Meller *et al.*,¹⁰ the mean pore current as a function of the chain length still decreases for chains longer

than this threshold value.¹⁸ Taking a PEG monomer length as $\sigma \approx 0.35$ nm,⁴⁰ the linear length of a chain of 38 PEG monomers is approximately equal to 13 nm. Translocation through α -hemolysin is essentially equivalent to the polymer transport through the stem channel. Unfolded, such a chain would greatly exceed the length of the stem (5 nm). The diameter of the smallest part of the α -hemolysin (≈ 1.5 nm⁵⁰) is about four PEG monomers lengths, we expect the confined polymer to be coiled as a linear chain of “blobs”⁵¹ under the voltages used in Ref. 18. The size of a blob is determined by the channel diameter (vestibule or stem depending of its position in the pore). For chains made of more than 38 PEG monomers, the additional monomers in the vestibule add a significant additional contribution to the drop in current. This contrasts with the case of Meller *et al.*,¹⁰ where the DNA was also extended in the vestibule. This might explain the continued decrease of the current for chains longer than N^* observed by Reiner *et al.*¹⁸

IV. CONCLUSION

Through the simulations, we have shown the importance of the location of a polymer-pore interaction in the electric-field-driven translocation of a charged polymer. When only one of the two ends of the pore is interacting with the polymer, the probability for the chain to enter the pore is naturally greatly affected when the pore side on which the polymer tries to enter is reversed. This is in agreement with experimental work testing the effect of a modification of the charge distribution inside the α -hemolysin pore on the polymer entry frequency from a given pore side.^{26–28} As well as the geometrical asymmetry of the α -hemolysin pore, the asymmetry of the interaction may play a significant role in the differences observed experimentally in the polymer entry frequency depending on which end the polymer enters.^{9,25} The position of the interaction also causes quantitative as well as qualitative changes in the dependence of the polymer translocation time τ on the chain length N . The qualitative behaviour of τ with N may serve as a criterion to resolve the location of the polymer-pore interaction in experiments, although the effects may be small compared to the thermal noise. We have demonstrated that a crossover exists in the relation between τ and N , regardless of the interacting pattern. The crossover corresponds to the maximum chain length that can be accommodated in the pore. This crossover has been identified in experimental results for single-stranded DNA¹⁰ and for PEG¹⁸ translocation through α -hemolysin. We have shown that the transition from a nonlinear to a linear dependence of the translocation time on the chain length does not arise from the entropy as suggested by Matysiak *et al.*³¹ It is rather the consequence of constant velocity transport of a portion of a long chain. The question of very long chains was out of the scope of this paper, at least for reason of excessive computational time. With our choice of parameters, we expect the linear behaviour of the translocation time with the chain length to be still valid for very long chains as it has been observed in experiments^{10,52} and numerical studies^{20,21,31} under appropriate conditions. Some of the qualitative factors of the dwell time were attributed to a crowding effect between monomers, which hinders the

chain's progress through the pore when the external force acting on it is not too strong, as is the case in many experiments. It would be interesting to study this point further.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank J. Pelta and A. Oukhaled for many useful discussions and introducing us to the problem of polymer translocation.

- ¹J. Bustamante, J. Hanover, and A. Liepins, *J. Membr. Biol.* **146**, 239 (1995).
- ²S. M. Simon and G. Blobel, *Cell* **65**, 371 (1991).
- ³J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13770 (1996).
- ⁴J. Clarke, H.-C. Wu, A. Jayasinghe, L. Patel, S. Reid, and H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.* **4**, 265 (2009).
- ⁵J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov, and J. J. Kasianowicz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 8207 (2007).
- ⁶J. Han, J. Fu, and R. B. Schoch, *Lab Chip* **8**, 23 (2008).
- ⁷W. Sung and P. J. Park, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 783 (1996).
- ⁸M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **111**, 10371 (1999).
- ⁹S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 3057 (2000).
- ¹⁰A. Meller, L. Nivon, and D. Branton, *Phys. Rev. Lett.* **86**, 3435 (2001).
- ¹¹A. Aksimentiev, *Nanoscale* **2**, 468 (2010).
- ¹²A. G. Oukhaled, A.-L. Biance, J. Pelta, L. Auvray, and L. Bacri, *Phys. Rev. Lett.* **108**, 088104 (2012).
- ¹³D. Wei, W. Yang, X. Jin, and Q. Liao, *J. Chem. Phys.* **126**, 204901 (2007).
- ¹⁴F. Kapahnke, U. Schmidt, D. W. Heermann, and M. Weiss, *J. Chem. Phys.* **132**, 164904 (2010).
- ¹⁵B. Luan and A. Aksimentiev, *Phys. Rev. E* **78**, 021912 (2008).
- ¹⁶B. Luan and A. Aksimentiev, *J. Phys.: Condens. Matter* **22**, 454123 (2010).
- ¹⁷C. T. A. Wong and M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **133**, 045101 (2010).
- ¹⁸J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo, and J. W. F. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12080 (2010).
- ¹⁹L.-Q. Gu, S. Cheley, and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 15498 (2003).
- ²⁰P. Tian and G. D. Smith, *J. Chem. Phys.* **119**, 11475 (2003).
- ²¹K. Luo, T. Ala-Nissila, S.-C. Ying, and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. E* **78**, 061918 (2008).
- ²²Y.-C. Chen, C. Wang, Y.-L. Zhou, and M.-B. Luo, *J. Chem. Phys.* **130**, 054902 (2009).
- ²³K. Luo, T. Ala-Nissila, S.-C. Ying, and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. Lett.* **99**, 148102 (2007).
- ²⁴L. Z. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, *Science* **274**, 1859 (1996).
- ²⁵G. Gibrat, M. Pastoriza-Gallego, B. Thiebot, M.-F. Breton, L. Auvray, and J. Pelta, *J. Phys. Chem. B* **112**, 14687 (2008).
- ²⁶G. Maglia, M. R. Restrepo, E. Mikhailova, and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 19720 (2008).
- ²⁷A. J. Wolfe, Mohammad M., S. Cheley, H. Bayley, and L. Movileanu, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14034 (2007).
- ²⁸M. M. Mohammad, S. Prakash, A. Matouschek, and L. Movileanu, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4081 (2008).
- ²⁹G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathe, J. Pelta, and L. Auvray, *EPL* **82**, 48003 (2008).
- ³⁰E. Slonkina and A. B. Kolomeisky, *J. Chem. Phys.* **118**, 7112 (2003).
- ³¹S. Matysiak, A. Montesi, M. Pasquali, A. B. Kolomeisky, and C. Clementi, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 118103 (2006).
- ³²C. G. Rodrigues, D. C. Machado, S. F. Chevtchenko, and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.* **95**, 5186 (2008).
- ³³K. Tasaki, *Comput. Theor. Polym. Sci.* **9**, 271 (1999).
- ³⁴M. F. Breton, F. Discala, L. Bacri, D. P. Foster, J. Pelta, and A. Oukhaled, preprint (2012).
- ³⁵J. A. Cohen, A. Chaudhuri, and R. Golestanian, *Phys. Rev. X* **2**, 021002 (2012).
- ³⁶H. Limbach, A. Arnold, B. Mann, and C. Holm, *Comp. Phys. Commun.* **174**, 704 (2006).
- ³⁷H. B. Callen and T. A. Welton, *Phys. Rev.* **83**, 34 (1951).
- ³⁸P. E. Rouse, *J. Chem. Phys.* **21**, 1272 (1953).
- ³⁹H. Lee, A. H. de Vries, S.-J. Marrink, and R. W. Pastor, *J. Phys. Chem. B* **113**, 13186 (2009).
- ⁴⁰P. L. Hansen, J. A. Cohen, R. Podgornik, and V. A. Parsegian, *Biophys. J.* **84**, 350 (2003).
- ⁴¹F. Farahpour, A. Maleknejad, F. Varnik, and M. R. Ejtehadi, *Soft Matter* **9**, 2750 (2013).
- ⁴²R. M. Jendrejack, D. C. Schwartz, J. J. de Pablo, and M. D. Graham, *J. Chem. Phys.* **120**, 2513 (2004).
- ⁴³I. Ali and J. M. Yeomans, *J. Chem. Phys.* **123**, 234903 (2005).
- ⁴⁴K. Luo and R. Metzler, *J. Chem. Phys.* **134**, 135102 (2011).
- ⁴⁵O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.* **97**, 018301 (2006).
- ⁴⁶L. I. Klushin, A. M. Skvortsov, H.-P. Hsu, and K. Binder, *Macromolecules* **41**, 5890 (2008).
- ⁴⁷K. De'Bell and T. Lookman, *Rev. Mod. Phys.* **65**, 87 (1993).
- ⁴⁸S. Bhattacharya, I. M. Derrington, M. Pavlenok, M. Niederweis, J. H. Gundlach, and A. Aksimentiev, *ACS Nano* **6**, 6960 (2012).
- ⁴⁹D. B. Wells, V. Abramkina, and A. Aksimentiev, *J. Chem. Phys.* **127**, 125101 (2007).
- ⁵⁰A. Aksimentiev and K. Schulten, *Biophys. J.* **88**, 3745 (2005).
- ⁵¹P. G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics* (Cornell University Press, Ithaca, 1979).
- ⁵²A. Meller and D. Branton, *Electrophoresis* **23**, 2583 (2002).

Chapitre 5

Effets collaboratifs dans la translocation de polymères et apparition de barrières d'énergie fictives

Expérimentalement il existe trois grands régimes caractérisant la translocation d'une macromolécule à travers un pore (voir chapitre 2). Dans le régime diffusif, la molécule traverse le pore en diffusant librement. Dans le régime électrophorétique, les forces favorisant la translocation (par exemple une force électrique) dominant et la traversée du pore est rapide. Dans le régime “ de barrière”, les forces s'opposant à la translocation (entropie de confinement dans le pore, interaction avec le pore) dominant et la traversée du pore est lente. La connaissance des effets dominant le passage d'une macromolécule à travers un pore pour un système expérimental donné est

importante en vue d’une utilisation contrôlée de la translocation, dans le cadre du séquençage d’ADN par exemple. La variation du temps de translocation de la molécule avec un paramètre de l’expérience est utilisée pour discriminer entre les différents régimes et pour quantifier l’action des forces en présence [11, 24, 84].

Meller and Branton [30] ont étudié la translocation d’ADN simple brin de différentes longueurs à travers le pore d’ α -hémolysine. Le temps de translocation augmente rapidement avec la longueur de l’ADN pour les ADN plus courts que le pore, puis augmente plus lentement et linéairement pour les longs brins (fig. 5.1). L’augmentation rapide du temps de translocation avec la longueur de la molécule est traditionnellement interprété comme la présence d’une barrière d’énergie libre dans le processus de traversée du pore [90, 91, 84, 88, 85]. Le temps nécessaire pour franchir cette barrière est alors considéré comme la contribution principale au temps de translocation. Cette interprétation réduit la translocation de la molécule entière à la diffusion de son centre de masse à travers le paysage d’énergie libre rencontré au cours de la traversée du pore. C’est la base des modèles de type Fokker-Planck [90, 91], qui ont été utilisés pour interpréter de nombreux résultats expérimentaux [84, 88, 85]. Cependant nos précédentes simulations de translocation d’une chaîne de monomères ont suggéré que les mouvements coordonnés des monomères circulant en file indienne dans le pore pouvaient également provoquer une augmentation rapide du temps de translocation [31]. Cet effet de collaboration a été ignoré jusqu’à présent dans la littérature. Dans les conditions expérimentales de Meller et Branton l’ADN est supposé traverser le pore en configuration étirée [30], avec une distance entre deux bases successives pouvant fluctuer de l’ordre de 20% [144].

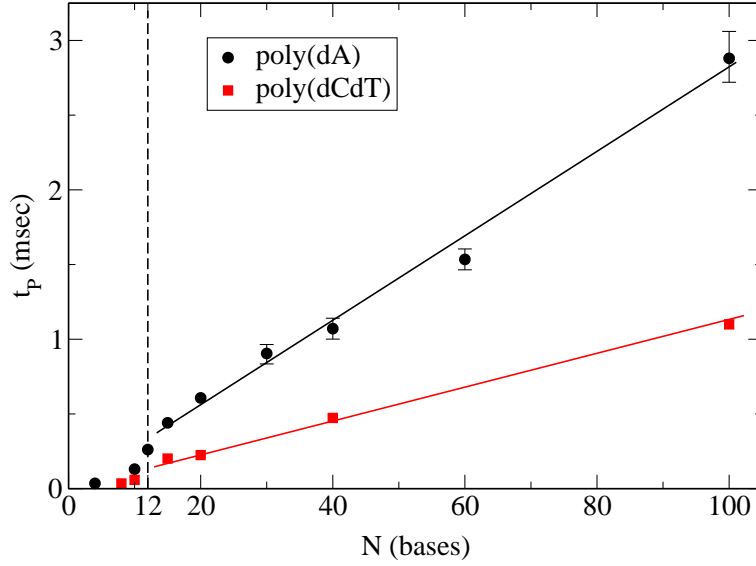


FIGURE 5.1 – Résultats expérimentaux de Meller et Branton [30] pour la translocation d’ADN simple brin à travers le pore d’ α -hémolysine. Les brins d’ADN sont constitués uniquement d’adénine (poly[dA]) ou alternativement de cytosine et de thymine (poly[dCdT]). Le temps de translocation le plus probable est tracé en fonction du nombre de bases dans le brin d’ADN.

Nous avons développé un nouveau modèle simple que nous utilisons pour simuler informatiquement la translocation d’un polymère à travers un pore. Ce modèle “à gros grain” nous permet d’étudier spécifiquement les effets collaboratifs entre les monomères à l’intérieur du pore et leur influence qualitative sur la relation entre le temps de translocation et la longueur du polymère. Ce travail est décrit dans l’article [32] qui suit, publié comme “Rapid Communication” dans *Physical Review E* en 2014.

Le modèle est inspiré du processus d’exclusion asymétrique (*ASEP pro-*

cess). Le polymère en translocation est représenté par la circulation des monomères à travers le pore. Les portions de polymère à l'extérieur du pore sont réduites à des réservoirs de monomères (un réservoir du côté initial, un autre du côté final). Dans le pore les monomères se déplacent en file indienne le long de l'axe central, en sautant de site en site sur un réseau discret. La connectivité du polymère est assurée par le fait que deux monomères successifs ne peuvent être plus proches qu'une certaine distance δx_{min} et ne peuvent être plus éloignés qu'une certaine distance δx_{max} . Nous nous sommes limités au cas d'un pore uniformément attractif. L'entrée d'un monomère dans le pore s'accompagne d'un gain d'énergie et d'une perte d'entropie (respectivement une perte d'énergie et un gain d'entropie à la sortie du pore). Dans le pore les monomères ressentent l'effet d'une force extérieure qui aide leur traversée. Cette force peut représenter l'action d'un champ électrique sur un polymère chargé ou l'entraînement par un flot électro-osmotique. La dynamique est de type Monte-Carlo, les déplacements sont conditionnés par les variations d'énergie libre du polymère d'une configuration à l'autre. Comme dans les modèles de type Fokker-Planck, les forces appliquées sont supposées être suffisamment faibles pour qu'à chaque instant le polymère soit dans un état de quasi-équilibre.

Nous nous sommes placés dans le cas particulier où l'attraction du pore compense exactement l'entropie de confinement dans le pore. Ceci garantit l'absence de barrière d'énergie libre durant toute la translocation. Seuls la force extérieure favorisant la traversée du pore et les mouvements des monomères dans le pore restent en jeu. La force extérieure est prise suffisamment faible pour permettre une compétition avec les mouvements de diffusion coordonnée des monomères dans le pore. Le pore peut contenir

12 monomères au maximum, à l'échelle du système expérimental ADN/ α -hémolysine de Meller et Branton. La dépendance du temps de translocation avec la longueur du polymère que nous avons observée est qualitativement similaire aux résultats expérimentaux. En particulier pour les polymères plus courts que le pore le temps de translocation augmente rapidement avec le nombre de monomères, tendance habituellement associée à une barrière d'énergie libre, alors que par construction une telle barrière n'existe pas. En ajustant le régime des polymères courts, nous avons estimé une barrière d'énergie libre fictive de $0.37k_B T$ par monomère avec nos valeurs de paramètres. Pour les polymères plus longs que le pore l'augmentation linéaire du temps de translocation est reproduite. Les temps de simulation sont beaucoup plus courts avec ce nouveau modèle que lors de la simulation de la dynamique d'une chaîne complète de monomères. Pour une longueur de polymère donnée, une statistique sur 2000 événements de translocation requiert quelques secondes de temps de simulation contre une durée de l'ordre du mois précédemment [31].

Le comportement du temps de translocation avec la longueur du polymère est attribué aux effets collaboratifs dans les mouvements des monomères dans le pore. Pour progresser dans le pore, un monomère doit trouver le site suivant libre et cette nouvelle position doit respecter la connectivité de la chaîne, c'est-à-dire ne pas être plus proche que δx_{min} et ne pas être plus éloignée que δx_{max} des monomères voisins. La diffusion de la chaîne de monomères est donc plus lente que la diffusion de son seul centre de masse sous l'effet de la force extérieure.

Nous avons décomposé le processus de translocation en trois étapes : remplissage du pore, transfert à travers le pore et vidange du pore. Dans le

régime des polymères plus courts que le pore, le temps de vidange domine le temps total de translocation. Les temps de remplissage et de vidange sont qualitativement similaires et augmentent rapidement avec la longueur du polymère. En effet, pour entrer ou sortir du pore, un monomère doit attendre que les autres monomères confinés soient dans une configuration autorisant son déplacement. Plus le nombre de monomères confinés est grand, plus leur collaboration pour aboutir à une telle configuration prend du temps. Lorsque le polymère devient plus long que le pore, les temps de remplissage et de vidange saturent. Le comportement linéaire du temps de translocation est alors dû au transfert des monomères à travers le pore à vitesse constante, comme observé précédemment [31].

Nous avons fait varier différents paramètres pour tester la robustesse de nos résultats. Ces résultats sont qualitativement reproduits lorsque les distances entre monomères δx_{min} et δx_{max} sont modifiées, ou lorsqu'une force de rappel entre monomères voisins est ajoutée. L'utilisation d'un pore plus long (pouvant contenir jusqu'à 80 monomères) rend la contribution du temps de transfert plus importante et l'interprétation du temps total plus délicate. Le comportement des temps de remplissage et de vidange n'est pas modifié aux courtes chaînes, mais des différences qualitatives apparaissent quand la longueur augmente. L'origine de ces différences reste inconnue. Les temps de remplissage et de vidange se confondent en l'absence de force extérieure, comme attendu.

Enfin nous avons testé l'effet d'une asymétrie de potentiel chimique entre le réservoir initial et le réservoir final de monomères. Les résultats obtenus ne sont pas inclus dans l'article et sont présentés en annexe. Nous nous sommes

limités au cas d'une asymétrie favorisant la translocation. Plus l'asymétrie de potentiel chimique favorise la translocation, plus la translocation est rapide. L'augmentation rapide du temps de translocation pour les courtes chaînes est atténuée à mesure que l'asymétrie augmente et que la force de traction générée domine les effets collaboratifs entre monomères confinés. De même la différence entre le régime des courtes chaînes et le régime linéaire des longues chaînes tend à disparaître : on tend vers un régime de translocation électrophorétique.

Pour conclure nous avons montré à l'aide d'un nouveau modèle simple de translocation l'importance que peuvent avoir les mouvements de diffusion collaborative des monomères confinés dans le pore. Leur effet sur la relation entre le temps de translocation et la longueur du polymère est qualitativement similaire à ce qui est habituellement interprété comme l'existence d'une barrière d'énergie libre, même en l'absence d'une telle barrière. En réduisant les portions de polymère hors du pore à des réservoirs de monomères, notre modèle requiert des temps de simulation beaucoup plus courts que lors de la simulation de la dynamique d'une chaîne complète.

Collaborative effects in polymer translocation and the appearance of fictitious free-energy barriers

D. P. Foster

Applied Mathematics Research Centre, Coventry University, Coventry CV1 5FB, United Kingdom

F. Piguet

Laboratoire de Physique Théorique et Modélisation, CNRS UMR No. 8089, Université de Cergy-Pontoise, 2 Avenue A. Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France

(Received 19 July 2013; published 28 March 2014)

The translocation time of a polymer through a pore under the influence of an external field depends on a number of parameters, the most important of which are the field strength, the interaction with the pore, and the confinement entropy. Experimentally, the translocation is dominated either by the driving force (electrophoretic regime) or by the entropy of confinement or pore interaction (barrier dominated regime). In this Rapid Communication we study a simple model for polymer translocation, loosely based on the asymmetric exclusion process, which shows that it is possible to have what experimentally would be interpreted as barrier dominated, even where there is no barrier to translocation. This effective barrier is interpreted as being due to collaborative effects between the monomers forming the polymer chain.

DOI: [10.1103/PhysRevE.89.030601](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.030601)

PACS number(s): 61.41.+e, 87.16.dp, 05.60.-k, 87.15.hj

The translocation of polymers through a nanopore is ubiquitous in the behavior of biological systems. Nanopores are used by the biological cell to exchange proteins [1] and used by toxins to destroy the cell [2]. Nanopores, both biological and synthetic, are used by experimentalists to study the conformational behavior of polymers and proteins [3,4] and their use provides a promising avenue for the fast sequencing of DNA molecules [5]. One of the most commonly used pores for these experiments is the α -hemolysin pore [6], corresponding to a self-inserting heptamer pore used by *Staphylococcus aureus* to attack biological cells. In experiments the presence of the polymer in the pore is detected by measuring the current of charged ions through the pore between electrodes. The presence of the polymer in the pore corresponds to a drop in the detected current [7].

While at first sight the problem of polymer translocation seems simple, there are many factors that need to be taken into account. Other than the loss of entropy of the polymer confined in the pore [8,9], there will in general also be an interaction between the monomers and the pore walls [10,11], as well as the driving effect of the electric field. The electric field acts either directly on the polymer (if charged [12–14]) or via an electro-osmotic pressure [15,16].

Experimental results due to Meller and Branton [11] for the translocation of ssDNA through an α -hemolysin pore are shown in Fig. 1 as an example of the translocation time dependence on polymer length. The length of the pore was about the same length as twelve bases and the passage of the monomers is believed to be single file. It can be seen that there are two regimes: For short chains there is a rapid increase in translocation time τ with chain length N , while for longer chains the time is essentially linear.

The rapid increase of τ with N is usually interpreted as indicating the presence of a free-energy barrier to translocation [8,9,17,18]. For short polymers it is expected that the crossing of this barrier will be the dominant factor in determining the translocation time, which then behaves as

$$\tau \sim \exp\left(\frac{\Delta F}{kT}\right), \quad (1)$$

where $\Delta F \propto N$ is the height of the free-energy barrier [9,17,19].

In this Rapid Communication we present a simple model for the driven translocation of a polymer through a pore. This model reproduces the same qualitative behavior as seen in Fig. 1. Surprisingly, the qualitative agreement arises even when the confinement entropy and pore interaction balance, i.e., when there is no free-energy barrier for the polymer at any stage of the translocation process. In this case, the behavior is interpreted as being a result of the collaborative effects in the driven diffusion of the monomers in the pore. This possibility is explicitly ignored in the translocation literature, which tends to model polymer translocation by reaction coordinate methods such as the Fokker-Planck method [8,9]. Our simple model also has the advantage of being several orders of magnitude faster than direct molecular dynamics simulation. This is particularly true in the weak driving force limit. This limit is of interest for the fast decoding of DNA sequences [5].

The idea is to model the translocating polymer as a stream of monomers moving through the pore. This is shown schematically in Fig. 2. The polymer chain is split into N_l monomers to the left of the pore (waiting to enter the pore), N_p monomers in the pore, and N_r monomers to the right of the pore (having exited the pore). The monomers outside the pore (to the left or right) are represented by two free-energy reservoirs of free energy $\mathcal{F}_{\text{left}}(N_l)$ and $\mathcal{F}_{\text{right}}(N_r)$ for the left and right reservoirs, respectively. We have $N_l + N_r + N_p = N$, the number of monomers making up the polymer.

The confined monomers progress on the central axis of the pore along discrete sites labeled $i \in [1, L]$. Each site can be either occupied or empty, representing the presence or absence of a monomer. We take the distance between lattice sites to be d . Unlike the standard asymmetric simple exclusion process (ASEP) model, we must model the fact that the monomers are chemically linked to their neighbors along the polymer chain. This is modeled by constraining the distance between monomers to be between a minimum distance $\delta x_{\text{min}} = d$ and some maximum distance δx_{max} , taken here to be $2d$. Once the monomers are in the pore they feel the applied electric field

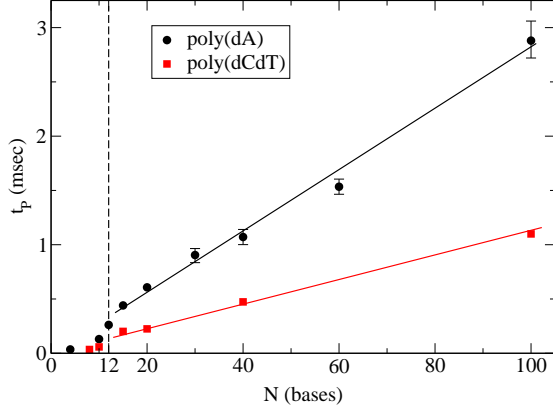


FIG. 1. (Color online) Experimental results for the translocation of single-stranded DNA molecules made up of either adenine [poly(dA)] or alternating cytosine and thymine [poly(dCdT)] taken from Meller and Branton [11]. The most probable translocation time t_p is plotted against chain length.

and hop preferentially to the right. To model the monomers entering or leaving the pore two additional sites are included ($i = 0$ and $i = L + 1$), representing the monomers about to enter or the space for the polymer to leave the pore as required. The state of these sites is not *a priori* determined, unlike the sites within the pore. The dynamics used for the simulation is detailed below.

Initially, all the monomers are contained in the left-hand-side reservoir. The translocation time is defined as the time it takes for all the monomers to cross the system and enter the right-hand-side reservoir. In order to implement the dynamics of the monomer hopping, a site $i \in [0, L + 1]$ is chosen at random and updated according to the following rules.

(i) If the site is empty nothing is done.

(ii) If the site is occupied with a monomer, a direction (left or right) is chosen at random with equal probability and the monomer is moved in the chosen direction if possible (i.e., if the neighboring site is empty and if the resulting maximal distance to its neighboring monomers is less than δx_{\max}). If the move is possible, the difference in the free energy $\delta\mathcal{F}$ of the system is calculated.

(a) If $\delta\mathcal{F} < 0$ the move is accepted.

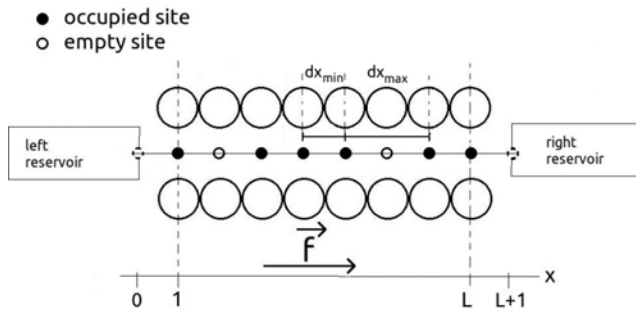


FIG. 2. Schematic diagram showing the pore modeled as a one-dimensional lattice. The external portions of the polymer are modeled as particle reservoirs at equilibrium. The particles hop preferentially to the right under the influence of the external force field \vec{f} .

(b) If $\delta\mathcal{F} > 0$ the move is accepted with a probability $\exp(-\delta\mathcal{F}/kT)$, where T is the system temperature.

(iii) If the chosen direction results in a monomer jumping on sites $i = 0$ or $i = L + 1$ then the monomer is removed from the pore and the corresponding reservoir free-energy difference is $\delta\mathcal{F}_{l/r} = \mathcal{F}_{l/r}(N_{l/r} + 1) - \mathcal{F}_{l/r}(N_{l/r})$.

(iv) If the site chosen is $i = 0$ or $i = L + 1$ then the sites are assumed to be occupied (assuming there are still monomers in the corresponding reservoir). If the direction chosen corresponds to the monomer entering the pore then the reservoir free-energy difference is $\delta\mathcal{F}_{l/r} = \mathcal{F}_{l/r}(N_{l/r} - 1) - \mathcal{F}_{l/r}(N_{l/r})$.

A time step corresponds to choosing on average each site once, i.e., one step corresponds to $L + 2$ single-site choices. A time step does not depend on the number of monomers in the pore or the number of monomers making up the polymer, as expected for a correctly defined time step.

The total change in free energy for one update is given by

$$\delta\mathcal{F} = \delta\mathcal{F}_l + \delta\mathcal{F}_r - qE\delta x - \varepsilon\delta N_p, \quad (2)$$

where q is the charge on the monomer, E is the uniform applied field in the pore, ε is the interaction energy with the pore (here $\varepsilon < 0$), $\delta x = 0, \pm d$ is the distance moved by the monomer (if present), and $\delta N_p = 0, \pm 1$ is the change in number of monomers in the pore. The free energy of the polymer segment in the reservoirs may be taken as

$$\mathcal{F}_{l/r} = -N_{l/r}kT \ln \tilde{z}, \quad (3)$$

where \tilde{z} is the effective coordination number (or connective constant). The value of \tilde{z} depends on the solvent quality. One could include the $(1 - \gamma_1) \ln N$ correction term, where γ_1 is the connective exponent for a self-avoiding walk with one end attached or close to a surface. This correction term is small compared to the leading term and is dropped. The chemical potential is essentially given by $kT \ln \tilde{z}$.

In what follows, we simplify the model further, taking $\varepsilon = kT \ln \mu$. This removes any possibility of a free-energy barrier to either polymer insertion or polymer exit from the pore. The behavior of the translocation time is then entirely determined by the dynamics of the monomers within the pore and the strength of the driving force qE .

In order to compare, at least qualitatively, with the results of Meller and Branton [11], presented in Fig. 1, we choose to study a pore of length $L = 12d$. The polymer was driven using a force $qE = 0.05kT/d$ in the pore. This value was chosen small enough for the translocation not to be electrophoretic, but to allow a competition between the collaborative effects within the chain and the driving force. The results presented here correspond to actual translocation events. There are translocation attempts that do not succeed, where the polymer retreats back into its original reservoir. For the parameters presented here, successful translocations corresponded to about 1/6 of events, largely independently of the polymer length. The translocation time as a function of length is shown in Fig. 3. Qualitatively, the figure is very similar to the experimental curve in Fig. 1.

The curve clearly shows the characteristic signal usually associated with a free-energy barrier, even though, by construction, there is no free-energy barrier. In the inset of Fig. 3 we fit the short-chain behavior by the exponential law given in

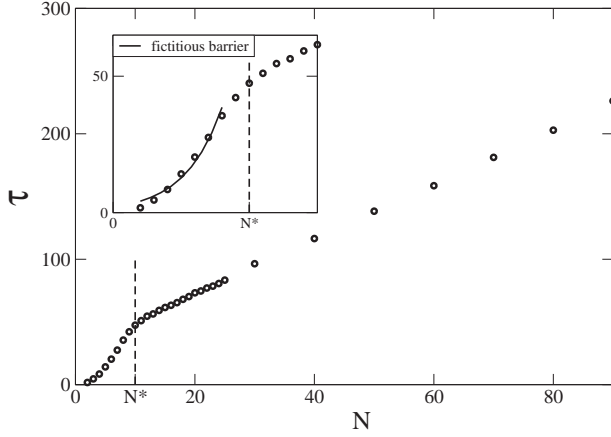


FIG. 3. Total translocation time as a function of the chain length for a pore of length $12d$. The inset shows a possible fit of the short-chain portion with a barrier model (1).

Eq. (1) with $\Delta F = \chi N$; a reasonable fit would give a value

$$\frac{\chi}{kT} = 0.37. \quad (4)$$

The system within the pore is not at equilibrium and the movement of the monomers is hindered by two effects: They cannot move forward until the site ahead is empty and they cannot move more than two lattice spaces from the previous monomer. This leads to a correlated movement that is slower than a simple driven diffusion of the center of mass. The translocation time is divided into three parts: the time to fill the pore (or for the polymer to completely enter the pore for short chains), the time for the polymer to transfer through the pore, and finally the time to empty the pore. Once the average linear dimension of the polymer exceeds the length of the pore, the filling and emptying times saturate and the length dependence is dictated by the transfer stage. In this regime the transfer velocity is constant and the translocation time becomes linear with the chain length [11, 13, 20]. The average distance between monomers $\sigma \in [d, 2d]$ and from Fig. 3 we see that $\sigma \approx 4d/3$.

The interesting portions of the translocation process for the discussion here are the filling and emptying times, shown in Figs. 4 and 5 for two pores of lengths $12d$ and $80d$. In both phases, the filling and emptying times vary rapidly for short chains. For a monomer to enter or leave the pore the other monomers must arrange themselves appropriately: For filling they must leave the first site empty and for emptying they must be close enough to the exiting monomer to enable its exit. This means that the monomers are correlated, defining a boundary correlation length. If the polymer length within the pore is smaller than this correlation length, the rate of adding a new monomer is sensitive to the number of monomers already in the pore. Beyond this correlation length, the correlation effects will saturate and no further change in the insertion rate is expected; the filling time then becomes linear with length. It is interesting that the emptying phase is not symmetric with respect to the filling phase because there is not the hole-particle symmetry present in the standard ASEP model (the monomers are linked and the holes are not). The influence of the exit is clearly visible in Fig. 5, where there is an inflection at $N \approx 20$.

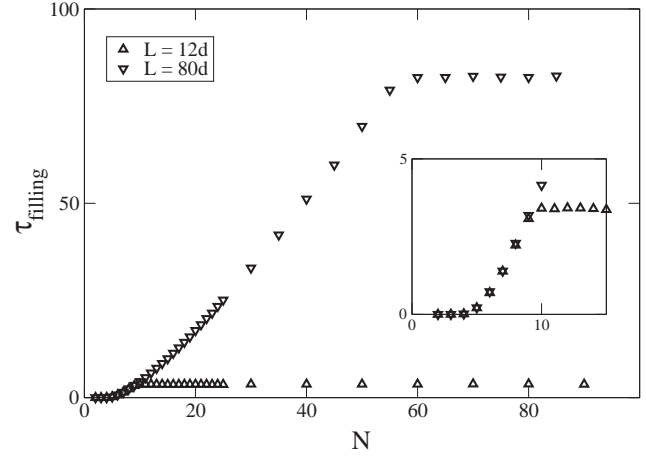


FIG. 4. Filling time as a function of chain length compared for two different pores, one of length $12d$ and one of length $80d$. The filling time is the time required to either fill the pore or fully enter the pore (depending on the length of the chain).

In the filling stage the curve seems to saturate to become linear, but does not show, at least at the pore lengths studied, an inflection. The reason for this difference in behavior remains an open question. Of course, in the absence of field, there is no difference between the filling and the emptying phases and the two curves are superimposed.

In Fig. 6 the different times are shown for the longer pore ($L = 80d$), as well as the resulting translocation time. While the filling and emptying times still show the exponential behavior (as discussed above), the effect of the transfer time is greater, which makes the total curve more difficult to interpret. This pore would correspond to a pore that is longer than the biological pores used in Meller and Branton [11] as a multiple of the monomer length. It would be interesting to know if in

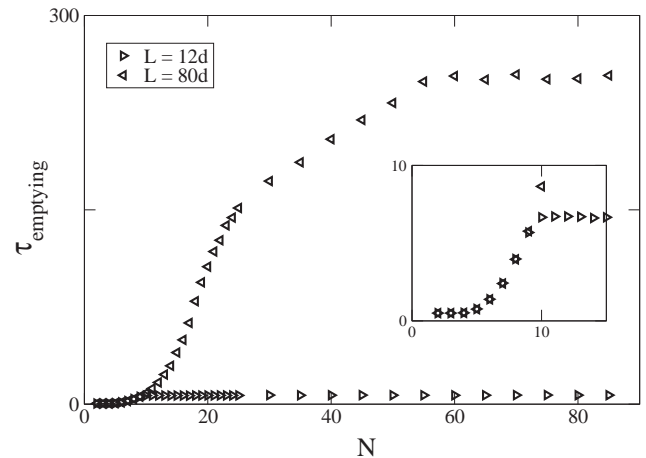


FIG. 5. Time to empty the pore as a function of chain length. The emptying time is defined as the time for the polymer to leave the pore measured from when the first monomer permanently leaves the pore, i.e., at no stage during the emptying process is the polymer totally within the pore.

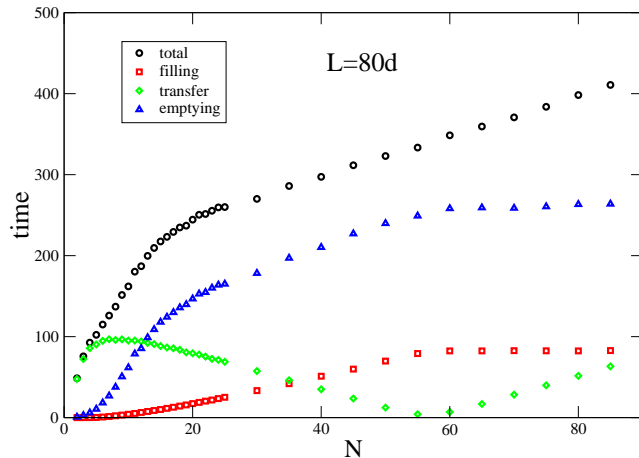


FIG. 6. (Color online) Different times are shown (filling, transfer, and emptying times) as well as the resulting translocation time for a pore of length $80d$.

longer pores a similar behavior would be observed in a real experiment.

The systematic interpretation of a rapidly varying translocation time with polymer length as a free-energy barrier is consistent with a vision of the dynamics of the polymer in terms of the diffusion of the center of mass. This interpretation is helped by comparing the experimental results with Fokker-Planck-type calculations, which explicitly reduce the polymer to a diffusion of the reaction coordinate. In this Rapid Communication we show that a simple model system where the collaborative dynamics of the monomers is explicitly allowed gives rise to the same behavior without an explicit free-energy barrier. This

is an important factor to take into account when interpreting or designing translocation experiments. One may imagine that the ssDNA molecule is rigid and thus the model adopted here is not realistic; however, experiments [21] show that the bond length may easily fluctuate 20% under the experimental conditions used by Meller and Branton [11]. We have looked at a modified model in which both δx_{\min} and δx_{\max} were modified and a Hooke's law force was added to the bonds, but the qualitative behavior was not affected. We also studied the situation where the chemical potential was not the same on each side of the pore. If the chemical potential difference was favorable to translocation, a fictitious barrier remained for a range of chemical potential differences, disappearing once the chemical potential difference reached a certain threshold.

It is often assumed that during the translocation process the portions of the polymer outside the pore have time to equilibrate [8,9]. While it is not obvious that this is always true, it is not an unreasonable assumption in the weak-field case studied here. This assumption is the basis of the main simplification of the translocation model used in this Rapid Communication. It enables us to calculate each point of Fig. 3 in a few seconds of CPU time rather than of the order of a month of CPU time for a model using Langevin dynamics on the full chain [20]. In any case, the assumption of equilibration outside the pore is consistent with what is used in Fokker-Planck calculations. The restriction of the dynamics to one dimension inside the pore is consistent with the translocation results presented by Meller and Branton [11], but even for looser polymers, such as polyethyl glycol, one might expect the translocation to be one dimensional but with the monomers being replaced by statistical blobs (in the manner of de Gennes [22]).

- [1] S. M. Simon and G. Blobel, *Cell* **65**, 371 (1991).
- [2] S. Bhakdi, U. Weller, I. Walev, E. Martin, D. Jonas, and M. Palmer, *Med. Microbiol. Immun.* **182**, 167 (1993).
- [3] G. Oukhaled, J. Mathé, A.-L. Biance, L. Bacri, J.-M. Betton, D. Lairez, J. Pelta, and L. Auvray, *Phys. Rev. Lett.* **98**, 158101 (2007).
- [4] A. Oukhaled, B. Cressiot, L. Bacri, M. Pastoriza-Gallego, J.-M. Betton, E. Bourhis, R. Jede, J. Gierak, L. Auvray, and J. Pelta, *ACS Nano* **5**, 3628 (2011).
- [5] D. Branton *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **26**, 1146 (2008).
- [6] L. Z. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, *Science* **274**, 1859 (1996).
- [7] J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13770 (1996).
- [8] W. Sung and P. J. Park, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 783 (1996).
- [9] M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **111**, 10371 (1999).
- [10] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1079 (2000).
- [11] A. Meller and D. Branton, *Electrophoresis* **23**, 2583 (2002).
- [12] S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 3057 (2000).
- [13] A. Meller, L. Nivon, and D. Branton, *Phys. Rev. Lett.* **86**, 3435 (2001).
- [14] M. F. Breton, F. Discala, L. Bacri, D. Foster, J. Pelta, and A. Oukhaled, *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 2202 (2013).
- [15] B. Luan and A. Aksimentiev, *Phys. Rev. E* **78**, 021912 (2008).
- [16] B. Luan and A. Aksimentiev, *J. Phys.: Condens. Matter* **22**, 454123 (2010).
- [17] O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.* **97**, 018301 (2006).
- [18] J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo, and J. W. F. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 12080 (2010).
- [19] C. G. Rodrigues, D. C. Machado, S. F. Chevtchenko, and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.* **95**, 5186 (2008).
- [20] F. Piguet and D. P. Foster, *J. Chem. Phys.* **138**, 084902 (2013).
- [21] C. Ke, M. Humeniuk, H. S-Gracz, and P. E. Marszalek, *Phys. Rev. Lett.* **99**, 018302 (2007).
- [22] P. G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics* (Cornell University Press, Ithaca, 1979).

Annexe

Le modèle présenté dans l'article précédent [32] est utilisé pour tester l'effet d'une asymétrie de potentiel chimique entre le réservoir initial et le réservoir final de monomères. Cette asymétrie traduit une différence de qualité de solvant [145, 93, 94] entre les deux côtés du pore, et peut par exemple provenir expérimentalement d'une différence de concentration en soluté [105, 132] ou de température [139] entre les deux compartiments. L'énergie d'interaction monomère/pore est maintenant différente entre l'entrée dans le pore depuis le réservoir initial (ϵ_{in}) et la sortie du pore dans le réservoir final (ϵ_{out}). Seul le cas d'une asymétrie favorisant la translocation ($\delta\epsilon = \epsilon_{out} - \epsilon_{in} < 0$) est considéré. Du côté initial l'énergie d'interaction monomère/pore compense le confinement entropique d'un monomère dans le pore ($\epsilon_{in} = kT \ln \tilde{z}$). Ceci évite toute barrière d'entrée dans le pore. Le pore a une longueur $L = 12d$ et les valeurs des autres paramètres sont inchangées par rapport à l'article.

La dépendance du temps de translocation avec la longueur du polymère pour différentes valeurs de $\delta\epsilon$ est présentée sur la figure 5.2. Pour $\delta\epsilon = 0$ nous retrouvons naturellement le comportement décrit dans l'article [32] dans des conditions symétriques de potentiel chimique : le temps de translocation augmente rapidement pour les polymères plus courts que le pore, puis il augmente plus lentement et linéairement pour les polymères plus longs que le pore. Plus l'asymétrie de potentiel chimique favorise la translocation ($\delta\epsilon$ de plus en plus négatif), plus la translocation est rapide. L'augmentation rapide du temps de translocation pour les courtes chaînes est atténuée à mesure que la force de traction due à l'asymétrie de potentiel chimique augmente et

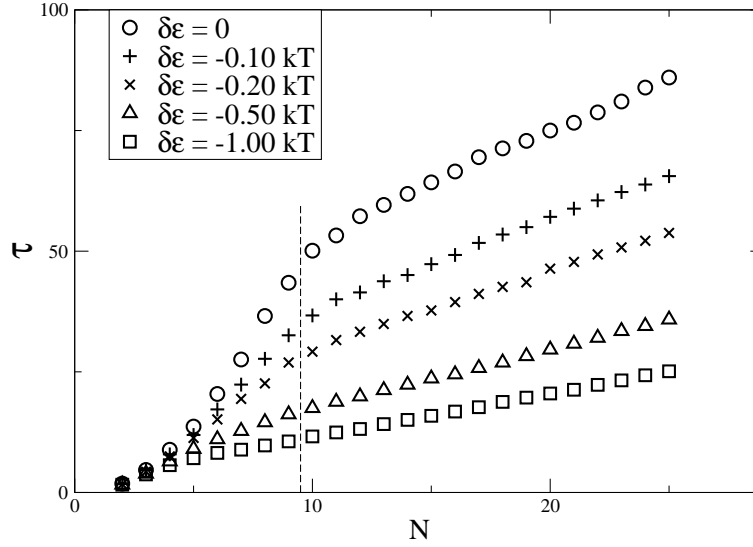


FIGURE 5.2 – Temps total de translocation en fonction de la longueur du polymère pour différentes valeurs d’asymétrie de potentiel chimique $\delta\epsilon$.

domine les effets de diffusion collaborative entre monomères confinés. Ainsi la différence entre le régime des courtes chaînes et le régime linéaire des longues chaînes tend à disparaître quand l’asymétrie augmente : on tend vers un régime de translocation électrophorétique, où le temps de translocation augmente linéairement avec la longueur de la chaîne, quelle que soit la longueur de la chaîne. Il est à noter que l’étude du régime électrophorétique est hors de la portée de ce travail : dans ce régime la translocation est rapide et l’approximation de quasi-équilibre du polymère à chaque instant de la translocation n’est plus valable.

La figure 5.3 détaille les étapes de la translocation (remplissage du pore, transfert à travers le pore et vidange du pore) pour différentes valeurs de $\delta\epsilon$. Quelle que soit la valeur de $\delta\epsilon$, les temps de remplissage et de vidange sa-

turent lorsque le polymère devient plus long que le pore et le comportement linéaire du temps total de translocation est alors dû au temps de transfert. Le temps de remplissage n'est pas affecté par $\delta\epsilon$: aucun monomère n'a encore traversé le pore pour sortir dans le réservoir final donc l'asymétrie de potentiel chimique n'est pas vue pendant cette étape. Pour les polymères plus longs que le pore, la phase de transfert s'accompagne de la sortie des premiers monomères du côté final. L'asymétrie est alors vue par le polymère. Plus l'asymétrie est grande, plus le transfert est rapide. Cependant ce n'est pas pendant la phase de transfert que l'accélération due à $\delta\epsilon$ est la plus significative : la force extérieure agissant sur chaque monomère dans le pore aide déjà suffisamment la traversée du pore. Le temps de vidange est lui aussi réduit lorsque $\delta\epsilon$ devient plus négatif. Le temps de vidange est le plus affecté par l'existence d'une asymétrie de potentiel chimique. Les variations du temps de vidange avec $\delta\epsilon$ sont la contribution majoritaire aux variations du temps total de translocation. Contrairement à l'étape de transfert, le nombre de monomères confinés dans le pore diminue pendant la vidange et donc la force extérieure agissant sur la partie confinée du polymère diminue également. La contribution de l'asymétrie de potentiel chimique pour extraire le polymère du pore est donc plus importante durant la vidange que durant le transfert.

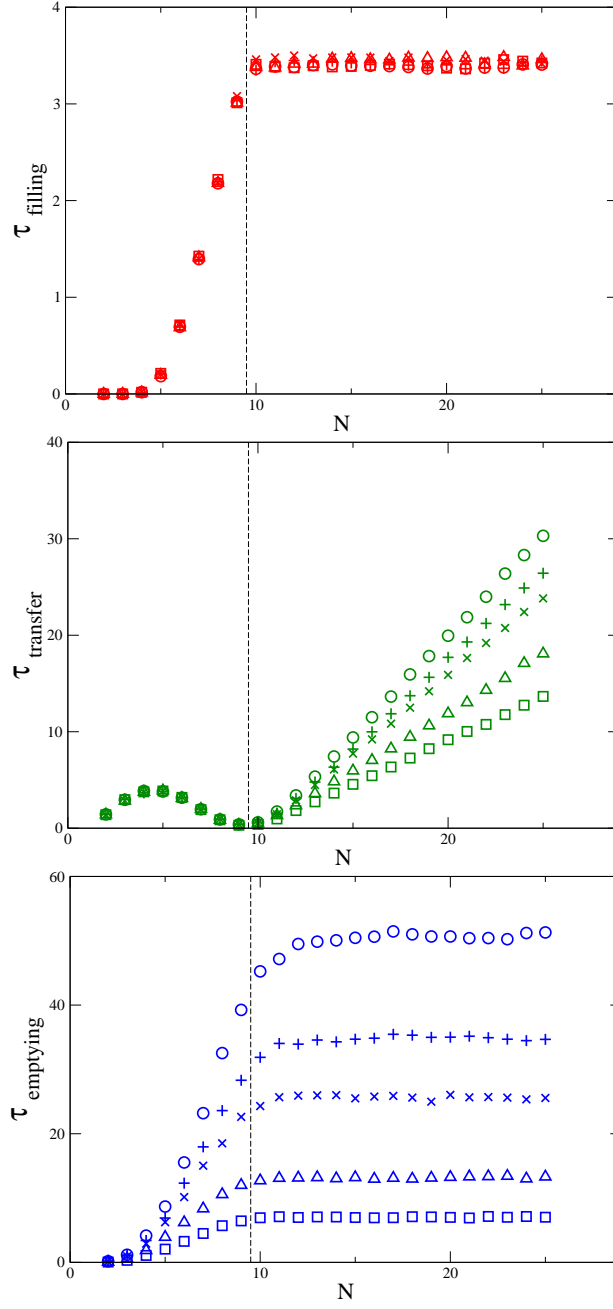


FIGURE 5.3 – Temps de remplissage du pore (haut), de transfert à travers le pore (milieu) et de vidange du pore (bas) en fonction de la longueur du polymère pour différentes valeurs d’asymétrie de potentiel chimique. Les symboles utilisés pour les différentes valeurs de $\delta\epsilon$ sont les mêmes que sur la figure 5.2

Conclusion et perspectives

Nous avons étudié à l'aide d'expériences et de simulations informatiques quelques-uns des principaux effets en jeu dans le processus de transport d'une macromolécule à travers un nanopore.

Expérimentalement nous avons montré l'existence d'un écoulement électro-osmotique à travers l'un des nanopores protéiques les plus couramment utilisés, l' α -hémolysine de *Staphylococcus aureus*. Cet écoulement conditionne l'entrée et la résidence de molécules électriquement neutres (β CD) dans le nanopore. La force de l'écoulement dépend du voltage appliqué, de la concentration des ions en solution mais également de la nature des ions ; en particulier nous avons montré que l'écoulement est plus fort en présence de LiCl que de KCl. L'effet de la nature des ions est un moyen particulièrement simple de contrôler la force de l'écoulement électroosmotique, sans avoir à modifier la structure du pore.

Les simulations informatiques nous ont permis d'étudier qualitativement l'effet d'une interaction entre le pore et un polymère transporté. En particulier la position de l'interaction modifie à la fois l'entrée et la résidence du polymère dans le pore. En revanche quelle que soit la position de l'interaction le temps de translocation augmente linéairement avec la longueur du polymère lorsque le polymère est plus long que le pore, en accord avec des résultats

expérimentaux publiés [29]. Cette transition avec la longueur du polymère n'est pas d'origine entropique, comme cela a été affirmé par ailleurs [136], mais vient de la phase de transfert à travers le pore d'un polymère plus long que le pore. Durant cette phase la sortie de chaque monomère compense l'entrée simultanée d'un monomère à l'autre extrémité du pore, laissant le polymère circuler à vitesse constante.

Un nouveau modèle a été développé pour simuler la translocation d'un polymère. Ce modèle permet de tenir compte explicitement de l'effet des mouvements collaboratifs des monomères confinés dans le pore, qui n'a jamais été pris en compte. Nous avons montré que cet effet génère un comportement du temps de translocation en fonction de la longueur du polymère qui est qualitativement similaire à ce qui habituellement interprété comme l'existence d'une barrière d'énergie libre durant la translocation, alors même qu'une telle barrière n'existe pas. En réduisant les portions de polymères à l'extérieur du pore à des réservoirs de monomères, le modèle permet de réduire fortement les temps de simulation comparé aux dynamiques moléculaires traditionnelles, tout en conservant une description du transport des monomères dans le pore plus détaillée que dans les modèles analytiques de type Fokker-Planck.

Les perspectives d'utilisation des nanopores comme détecteurs à l'échelle moléculaire ou sub-moléculaire sont très larges. Dans la continuité de cette thèse, il est naturel de chercher à utiliser le contrôle de l'écoulement électro-osmotique à travers l' α -hémolysine en fonction du type d'ion utilisé pour étudier le transport et/ou le dépliement de molécules, tels que des peptides, dans des conditions physiologiques par exemple. Il serait intéressant de trouver l'origine des changements de comportement observés lors de l'augmen-

tation de la concentration en sel, peut-être liés à une interaction entre le pore et les ions en solution. Le phénomène d'électroosmose pourrait aussi être étudié dans d'autres pores protéiques moins connus que l' α -hémolysine, comme l'aérolysine. Par ailleurs l' α -hémolysine et l'aérolysine semblent être de bons candidats pour mesurer le nombre de sous-unités présentes dans un polymère en translocation en fonction du bouchage de courant provoqué [135, 88, 146] ; l'effet de la température sur la résolution de la mesure pourrait par exemple être considéré. Un projet est en cours dans ce sens.

Du point de vue des simulations, il serait intéressant de relier la distribution de charges à l'intérieur du nanopore avec le sens et la force de l'écoulement électroosmotique. Bien que les expériences utilisant des pores mutants aient montré l'importance de la distribution de charges sur l'écoulement électroosmotique pouvant contrôler l'entrée et le résidence des molécules dans le pore [108], la plupart des travaux théoriques ont considéré l'effet d'une charge répartie uniformément sur la surface interne du pore [147, 148, 149]. Par ailleurs nous avons commencé à étendre le nouveau modèle de translocation présenté au chapitre 5 de cette thèse, pour décrire les mouvements des monomères à la fois à l'intérieur et à l'extérieur du pore en gardant la flexibilité des liaisons entre monomères à l'origine des effets collaboratifs observés dans le pore. Une première application serait d'étudier l'effet d'une différence de qualité de solvant entre les compartiments initial et final, avec cette fois une "vraie" chaîne de monomères à l'extérieur du pore.

Bibliographie

- [1] B. Hille, *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, 1992.
- [2] J. Bustamante, J. Hanover, and A. Liepins, “The ion channel behavior of the nuclear pore complex,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 146, pp. 239–251, 1995.
- [3] V. Citovsky and P. Zambryski, “Transport of nucleic acids through membrane channels : Snaking through small holes,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 167–197, 1993. PMID : 8257097.
- [4] S. M. Simon and G. Blobel, “A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum,” *Cell*, vol. 65, pp. 371 – 380, 1991.
- [5] K. E. Matlack, W. Mothes, and T. A. Rapoport, “Protein translocation : Tunnel vision,” *Cell*, vol. 92, no. 3, pp. 381 – 390, 1998.
- [6] T. A. Rapoport, “Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes,” *Nature*, vol. 450, pp. 663–669, 2007.
- [7] C. Berrier, M. Bonhivers, L. Letellier, and A. Ghazi, “High-conductance channel induced by the interaction of phage lambda with its receptor maltoporin,” *FEBS Letters*, vol. 476, no. 3, pp. 129 – 133, 2000.
- [8] O. Lambert, L. Letellier, W. M. Gelbart, and J.-L. Rigaud, “DNA delivery by phage as a strategy for encapsulating toroidal condensates of arbitrary size into liposomes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 13, pp. 7248–7253, 2000.
- [9] S. B. Hladky and D. A. Haydon, “Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics,” *Nature*, vol. 225, pp. 451–453, 1970.

- [10] E. Neher and B. Sakmann, "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres," *Nature*, vol. 260, pp. 799–802, 1976.
- [11] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, "Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, pp. 13770–13773, 1996.
- [12] W. H. Coulter, "Means for counting particles suspended in a fluid," 1953. US Patent 2656508.
- [13] J. Han, J. Fu, and R. B. Schoch, "Molecular sieving using nanofilters : Past, present and future," *Lab Chip*, vol. 8, pp. 23–33, 2008.
- [14] J. Zimmerberg and V. A. Parsegian, "Polymer inaccessible volume changes during opening and closing of a voltage-dependent ionic channel," *Nature*, vol. 323, pp. 36–39, 1986.
- [15] O. Krasilnikov, R. Sabirov, V. Ternovsky, P. Merzliak, and J. Muratkhodjaev, "A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 105, no. 1–3, pp. 93 – 100, 1992.
- [16] I. Vodyanoy and S. Bezrukov, "Sizing of an ion pore by access resistance measurements," *Biophysical Journal*, vol. 62, no. 1, pp. 10 – 11, 1992.
- [17] S. Bezrukov and I. Vodyanoy, "Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states," *Biophysical Journal*, vol. 64, pp. 16–25, 1993.
- [18] M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, and D. W. Deamer, "Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules," *Biophysical Journal*, vol. 77, pp. 3227–3233, 1999.
- [19] D. W. Deamer and D. Branton, "Characterization of nucleic acids by nanopore analysis," *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, pp. 817–825, 2002.
- [20] D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Melner, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni,

- V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss, “The potential and challenges of nanopore sequencing,” *Nature Biotechnology*, vol. 26, pp. 1146–1153, 2008.
- [21] G. Oukhaled, J. Mathé, A.-L. Biance, L. Bacri, J.-M. Betton, D. Lairez, J. Pelta, and L. Auvray, “Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 98, p. 158101, Apr 2007.
- [22] A. Oukhaled, B. Cressiot, L. Bacri, M. Pastoriza-Gallego, J.-M. Betton, E. Bourhis, R. Jede, J. Gierak, L. Auvray, and J. Pelta, “Dynamics of completely unfolded and native proteins through solid-state nanopores as a function of electric driving force,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 5, pp. 3628–3638, 2011.
- [23] C. Merstorf, B. Cressiot, M. Pastoriza-Gallego, A. Oukhaled, J.-M. Betton, L. Auvray, and J. Pelta, “Wild type, mutant protein unfolding and phase transition detected by single-nanopore recording,” *ACS Chemical Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 652–658, 2012.
- [24] B. Cressiot, A. Oukhaled, G. Patriarche, M. Pastoriza-Gallego, J.-M. Betton, L. Auvray, M. Muthukumar, L. Bacri, and J. Pelta, “Protein transport through a narrow solid-state nanopore at high voltage : Experiments and theory,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 7, pp. 6236–6243, 2012.
- [25] A. Oukhaled, L. Bacri, M. Pastoriza-Gallego, J.-M. Betton, and J. Pelta, “Sensing proteins through nanopores : Fundamental to applications,” *ACS Chemical Biology*, vol. 7, no. 12, pp. 1935–1949, 2012.
- [26] C. M. Dobson, “Protein folding and misfolding,” *Nature*, vol. 426, pp. 884–890, 2003.
- [27] R. Zimmermann, L. Müller, and B. Wullich, “Protein transport into the endoplasmic reticulum : mechanisms and pathologies,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12, no. 12, pp. 567 – 573, 2006.
- [28] F. Piguet, F. Discala, M. F. Breton, J. Pelta, L. Bacri, and A. Oukhaled, “Electroosmosis through alpha-hemolysin depends on alkali cation type,” submitted to *ACS Nano*.
- [29] A. Meller, L. Nivon, and D. Branton, “Voltage-driven DNA translocations through a nanopore,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 86, pp. 3435–3438, 2001.
- [30] A. Meller and D. Branton, “Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore,” *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 2583–2591, 2002.

- [31] F. Piguet and D. P. Foster, “Translocation of short and long polymers through an interacting pore,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 138, p. 084902, 2013.
- [32] D. P. Foster and F. Piguet, “Collaborative effects in polymer translocation and the appearance of fictitious free-energy barriers,” *Phys. Rev. E*, vol. 89, p. 030601, Mar 2014.
- [33] N. G. Stanley-Wood and R. W. Lines, eds., *Particle Size Analysis*. Special Publication, The Royal Society of Chemistry, 1992.
- [34] D. Ribbons and J. Norris, *Methods in microbiology*, vol. 1. Elsevier Science, 1969.
- [35] R. W. DeBlois and C. P. Bean, “Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 41, no. 7, pp. 909–916, 1970.
- [36] R. W. DeBlois and R. K. Wesley, “Sizes and concentrations of several type C oncornaviruses and bacteriophage T2 by the resistive-pulse technique,” *Journal of Virology*, vol. 23, no. 2, pp. 227–233, 1977.
- [37] P. Mueller, D. O. Rudin, H. Ti Tien, and W. C. Wescott, “Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system,” *Nature*, vol. 194, pp. 979–980, 1962.
- [38] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Wescott, “Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 67, no. 2, pp. 534–535, 1963.
- [39] E. Neher and J. H. Steinbach, “Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels,” *The Journal of Physiology*, vol. 277, no. 1, pp. 153–176, 1978.
- [40] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, and V. A. Parsegian, “Counting polymers moving through a single ion channel,” *Nature*, vol. 370, pp. 279–281, 1994.
- [41] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, and J. J. Kasianowicz, “Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore,” *Macromolecules*, vol. 29, pp. 8517–8522, 1996.
- [42] L. Movileanu and H. Bayley, “Partitioning of a polymer into a nanoscopic protein pore obeys a simple scaling law,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 18, pp. 10137–10141, 2001.
- [43] G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathé, J. Pelta, and L. Auvray, “Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores,” *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 82, no. 4, p. 48003, 2008.

- [44] L. Brun, M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathé, L. Bacri, L. Auvray, and J. Pelta, “Dynamics of polyelectrolyte transport through a protein channel as a function of applied voltage,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, p. 158302, Apr 2008.
- [45] G. Gibrat, M. Pastoriza-Gallego, B. Thiebot, M.-F. Breton, L. Auvray, and J. Pelta, “Polyelectrolyte entry and transport through an asymmetric alpha-hemolysin channel,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 47, pp. 14687–14691, 2008.
- [46] S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz, “Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 85, pp. 3057–3060, 2000.
- [47] S. M. Bezrukov, L. Kullman, and M. Winterhalter, “Probing sugar translocation through maltoporin at the single channel level,” *FEBS Letters*, vol. 476, no. 3, pp. 224 – 228, 2000.
- [48] L. Kullman, M. Winterhalter, and S. M. Bezrukov, “Transport of maltodextrins through maltoporin : A single-channel study,” *Biophysical Journal*, vol. 82, no. 2, pp. 803 – 812, 2002.
- [49] L. Movileanu, J. P. Schmittschmitt, J. M. Scholtz, and H. Bayley, “Interactions of peptides with a protein pore,” *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 2, pp. 1030 – 1045, 2005.
- [50] A. J. Wolfe, Mohammad, S. Cheley, H. Bayley, and L. Movileanu, “Catalyzing the translocation of polypeptides through attractive interactions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, pp. 14034–14041, 2007.
- [51] M. Mohammad and L. Movileanu, “Excursion of a single polypeptide into a protein pore : simple physics, but complicated biology,” *European Biophysics Journal*, vol. 37, no. 6, pp. 913–925, 2008.
- [52] R. Bikwemu, A. J. Wolfe, X. Xing, and L. Movileanu, “Facilitated translocation of polypeptides through a single nanopore,” *Journal of Physics : Condensed Matter*, vol. 22, no. 45, p. 454117, 2010.
- [53] K. Mahendran, C. Chimere, T. Mach, and M. Winterhalter, “Antibiotic translocation through membrane channels : temperature-dependent ion current fluctuation for catching the fast events,” *European Biophysics Journal*, vol. 38, no. 8, pp. 1141–1145, 2009.
- [54] J.-M. Pages, C. E. James, and M. Winterhalter, “The porin and the permeating antibiotic : a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria,” *Nat Rev Micro*, vol. 6, pp. 893–903, 2008.

- [55] Mohammad, S. Prakash, A. Matouschek, and L. Movileanu, "Controlling a single protein in a nanopore through electrostatic traps," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, pp. 4081–4088, 2008.
- [56] R. Stefureac, L. Waldner, P. Howard, and J. S. Lee, "Nanopore analysis of a small 86-residue protein," *Small*, vol. 4, no. 1, pp. 59–63, 2008.
- [57] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, and J. A. Golovchenko, "Ion-beam sculpting at nanometre length scales," *Nature*, vol. 412, pp. 166–169, 2001.
- [58] A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H. W. Zandbergen, and C. Dekker, "Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision," *Nat Mater*, vol. 2, pp. 537–540, 2003.
- [59] A. Mara, Z. Siwy, C. Trautmann, J. Wan, and F. Kamme, "An asymmetric polymer nanopore for single molecule detection," *Nano Letters*, vol. 4, no. 3, pp. 497–501, 2004.
- [60] G. Maglia, M. R. Restrepo, E. Mikhailova, and H. Bayley, "Enhanced translocation of single DNA molecules through α -hemolysin nanopores by manipulation of internal charge," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, pp. 19720–19725, 2008.
- [61] P. Chen, T. Mitsui, D. B. Farmer, J. Golovchenko, R. G. Gordon, and D. Branton, "Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores," *Nano Letters*, vol. 4, no. 7, pp. 1333–1337, 2004.
- [62] M. Wanunu and A. Meller, "Chemically modified solid-state nanopores," *Nano Letters*, vol. 7, no. 6, pp. 1580–1585, 2007.
- [63] L. Steinbock, G. Stober, and U. Keyser, "Sensing DNA-coatings of microparticles using micropipettes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 8, pp. 2423 – 2427, 2009.
- [64] A. R. Hall, A. Scott, D. Rotem, K. K. Mehta, H. Bayley, and C. Dekker, "Hybrid pore formation by directed insertion of alpha-haemolysin into solid-state nanopores," *Nat Nano*, vol. 5, pp. 874–877, 2010.
- [65] N. A. W. Bell, C. R. Engst, M. Ablay, G. Divitini, C. Ducati, T. Liedl, and U. F. Keyser, "DNA origami nanopores," *Nano Letters*, vol. 12, no. 1, pp. 512–517, 2012.
- [66] R. Wei, T. G. Martin, U. Rant, and H. Dietz, "DNA origami gatekeepers for solid-state nanopores," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, no. 20, pp. 4864–4867, 2012.

- [67] S. W. Kowalczyk, L. Kapinos, T. R. Blosser, T. Magalhaes, P. van Nies, L. Y. H., and C. Dekker, "Single-molecule transport across an individual biomimetic nuclear pore complex," *Nat Nano*, vol. 6, pp. 433–438, 2011.
- [68] E. C. Yusko, J. M. Johnson, S. Majd, P. Prangkio, R. C. Rollings, J. Li, J. Yang, and M. Mayer, "Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls," *Nat Nano*, vol. 6, pp. 253–260, 2011.
- [69] H. Bayley and C. R. Martin, "Resistive-pulse sensing from microbes to molecules," *Chemical Reviews*, vol. 100, no. 7, pp. 2575–2594, 2000.
- [70] I. Szabò, G. Bãthori, F. Tombola, A. Coppola, I. Schmehl, M. Brini, A. Ghazi, V. D. Pinto, and M. Zoratti, "Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin," *The FASEB Journal*, vol. 12, no. 6, pp. 495–502, 1998.
- [71] L. Z. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, "Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore," *Science*, vol. 274, pp. 1859–1866, 1996.
- [72] S. Bhakdi, H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, U. Weller, M. Kehoe, and M. Palmer, "Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-o, and escherichia coli hemolysin : prototypes of pore-forming bacterial cytolysins," *Archives of Microbiology*, vol. 165, no. 2, pp. 73–79, 1996.
- [73] E. Gouaux, "Alpha-hemolysin from staphylococcus aureus : An archetype of beta-barrel, channel-forming toxins," *Journal of Structural Biology*, vol. 121, no. 2, pp. 110 – 122, 1998.
- [74] M. Montoya and E. Gouaux, "Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1609, no. 1, pp. 19 – 27, 2003.
- [75] S. Galdiero and E. Gouaux, "High resolution crystallographic studies of alpha-hemolysin–phospholipid complexes define heptamer–lipid head group interactions : Implication for understanding protein–lipid interactions," *Protein Science*, vol. 13, no. 6, pp. 1503–1511, 2004.
- [76] I. Cozmuta, J. T. O’Keeffe, D. Bose, and V. Stolc, "Hybrid MD-Nernst Planck model of alpha-hemolysin conductance properties," *Molecular Simulation*, vol. 31, no. 2-3, pp. 79–93, 2005.
- [77] G. Menestrina, "Ionic channels formed by staphylococcus aureus alpha-toxin : Voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent

- cations,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 90, no. 2, pp. 177–190, 1986.
- [78] S. Y. Noskov, W. Im, and B. Roux, “Ion permeation through the alpha-hemolysin channel : Theoretical studies based on brownian dynamics and Poisson-Nernst-Planck electrodiffusion theory,” *Biophysical Journal*, vol. 87, no. 4, pp. 2299 – 2309, 2004.
 - [79] A. Aksimentiev and K. Schulten, “Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics : Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map,” *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 6, pp. 3745 – 3761, 2005.
 - [80] D. W. Deamer and D. Branton, “Characterization of nucleic acids by nanopore analysis,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, no. 10, pp. 817–825, 2002.
 - [81] S. M. Bezrukov and J. J. Kasianowicz, “The charge state of an ion channel controls neutral polymer entry into its pore,” *European Biophysics Journal*, vol. 26, no. 6, pp. 471–476, 1997.
 - [82] R. K. Bortoletto and R. J. Ward, “A stability transition at mildly acidic pH in the alpha-hemolysin (alpha-toxin) from staphylococcus aureus,” *FEBS Letters*, vol. 459, no. 3, pp. 438 – 442, 1999.
 - [83] X.-f. Kang, L.-Q. Gu, S. Cheley, and H. Bayley, “Single protein pores containing molecular adapters at high temperatures,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 10, pp. 1495–1499, 2005.
 - [84] O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov, “Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 97, p. 018301, 2006.
 - [85] C. G. Rodrigues, D. C. Machado, S. F. Chevtchenko, and O. V. Krasilnikov, “Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors,” *Biophysical Journal*, vol. 95, pp. 5186–5192, 2008.
 - [86] M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathé, B. Thiebot, J.-M. Betton, L. Auvray, and J. Pelta, “Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording : Loss of structural asymmetry,” *FEBS Letters*, vol. 581, no. 18, pp. 3371 – 3376, 2007.
 - [87] M. Pastoriza-Gallego, G. Gibrat, B. Thiebot, J.-M. Betton, and J. Pelta, “Polyelectrolyte and unfolded protein pore entrance depends on the pore geometry,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1788, no. 6, pp. 1377 – 1386, 2009.

- [88] J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo, and J. W. F. Robertson, "Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 27, pp. 12080–12085, 2010.
- [89] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton, "Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 3, pp. 1079–1084, 2000.
- [90] W. Sung and P. J. Park, "Polymer translocation through a pore in a membrane," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 77, pp. 783–786, 1996.
- [91] M. Muthukumar, "Polymer translocation through a hole," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 111, no. 22, pp. 10371–10374, 1999.
- [92] A. G. Oukhaled, A.-L. Biance, J. Pelta, L. Auvray, and L. Bacri, "Transport of long neutral polymers in the semidilute regime through a protein nanopore," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 108, p. 088104, Feb 2012.
- [93] D. Wei, W. Yang, X. Jin, and Q. Liao, "Unforced translocation of a polymer chain through a nanopore : The solvent effect," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 126, no. 20, p. 204901, 2007.
- [94] F. Kapahnke, U. Schmidt, D. W. Heermann, and M. Weiss, "Polymer translocation through a nanopore : The effect of solvent conditions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 132, no. 16, p. 164904, 2010.
- [95] P. Tian and G. D. Smith, "Translocation of a polymer chain across a nanopore : A brownian dynamics simulation study," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 119, pp. 11475–11483, 2003.
- [96] D. K. Lubensky and D. R. Nelson, "Driven polymer translocation through a narrow pore," *Biophysical Journal*, vol. 77, no. 4, pp. 1824 – 1838, 1999.
- [97] K. Luo, T. Ala-Nissila, S.-C. Ying, and A. Bhattacharya, "Translocation dynamics with attractive nanopore-polymer interactions," *Phys. Rev. E*, vol. 78, p. 061918, 2008.
- [98] K. Luo, T. Ala-Nissila, S.-C. Ying, and A. Bhattacharya, "Influence of polymer-pore interactions on translocation," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 99, p. 148102, Oct 2007.
- [99] P. G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca : Cornell University Press, 1979.
- [100] C. Plesa, S. W. Kowalczyk, R. Zinsmeister, A. Y. Grosberg, Y. Rabin, and C. Dekker, "Fast translocation of proteins through solid state nanopores," *Nano Letters*, vol. 13, no. 2, pp. 658–663, 2013.

- [101] M. von Smoluchowski, “Versuch einer mathematischen theorie der koagulationskinetik kolloider losungen,” *Zeitschrift fur physikalische Chemie*, vol. 92, pp. 129–168, 1917.
- [102] H. Berg and E. Purcell, “Physics of chemoreception,” *Biophysical Journal*, vol. 20, no. 2, pp. 193 – 219, 1977.
- [103] M. F. Breton, F. Discala, L. Bacri, D. Foster, J. Pelta, and A. Ou-khaled, “Exploration of neutral versus polyelectrolyte behavior of poly(ethylene glycol)s in alkali ion solutions using single-nanopore recording,” *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 4, no. 13, pp. 2202–2208, 2013.
- [104] M. Muthukumar, “Theory of capture rate in polymer translocation,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 132, no. 19, p. 195101, 2010.
- [105] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller, “Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient,” *Nat Nano*, vol. 5, pp. 160–165, 2010.
- [106] A. Y. Grosberg and Y. Rabin, “DNA capture into a nanopore : Interplay of diffusion and electrohydrodynamics,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 133, no. 16, p. 165102, 2010.
- [107] F. Farahpour, A. Maleknejad, F. Varnik, and M. R. Ejtehadi, “Chain deformation in translocation phenomena,” *Soft Matter*, vol. 9, pp. 2750–2759, 2013.
- [108] L.-Q. Gu, S. Cheley, and H. Bayley, “Electroosmotic enhancement of the binding of a neutral molecule to a transmembrane pore,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 26, pp. 15498–15503, 2003.
- [109] P. Chen, J. Gu, E. Brandin, Y.-R. Kim, Q. Wang, and D. Branton, “Probing single DNA molecule transport using fabricated nanopores,” *Nano Letters*, vol. 4, no. 11, pp. 2293–2298, 2004.
- [110] G. Gibrat, M. Pastoriza-Gallego, B. Thiebot, M.-F. Breton, L. Auvray, and J. Pelta, “Polyelectrolyte entry and transport through an asymmetric alpha-hemolysin channel,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, pp. 14687–14691, 2008.
- [111] T. Ambjornsson, S. P. Apell, Z. Konkoli, E. A. Di Marzio, and J. J. Kasianowicz, “Charged polymer membrane translocation,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 117, no. 8, pp. 4063–4073, 2002.
- [112] A. Einstein, “Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen,” *Annalen der Physik*, vol. 322, pp. 549–560, 1905.

- [113] M. von Smoluchowski, “Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen,” *Annalen der Physik*, vol. 326, pp. 756–780, 1906.
- [114] G. G. Stokes, “Report on recent researches on hydrodynamics. British association for the advancement of science, Report (1846),” in *Mathematical and Physical Papers vol.1*, vol. 1, pp. 157–187, Cambridge University Press, 2009. Cambridge Books Online.
- [115] L. Bacri, A. G. Oukhaled, B. Schiedt, G. Patriarche, E. Bourhis, J. Gierak, J. Pelta, and L. Auvray, “Dynamics of colloids in single solid-state nanopores,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 12, pp. 2890–2898, 2011.
- [116] J. Prince E. Rouse, “A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solutions of coiling polymers,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 21, pp. 1272–1280, 1953.
- [117] M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller, “DNA translocation governed by interactions with solid-state nanopores,” *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 10, pp. 4716 – 4725, 2008.
- [118] M. Muthukumar, “Translocation of a confined polymer through a hole,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 86, pp. 3188–3191, Apr 2001.
- [119] H. Risken, “Fokker-planck equation,” in *The Fokker-Planck Equation*, vol. 18 of *Springer Series in Synergetics*, pp. 63–95, Springer Berlin Heidelberg, 1984.
- [120] K. De’Bell and T. Lookman, “Surface phase transitions in polymer systems,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 65, pp. 87–113, 1993.
- [121] E. Slonkina and A. B. Kolomeisky, “Polymer translocation through a long nanopore,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 118, pp. 7112–7118, 2003.
- [122] S. Bhattacharya, J. Muzard, L. Payet, J. Mathé, U. Bockelmann, A. Aksimentiev, and V. Viasnoff, “Rectification of the current in alpha-hemolysin pore depends on the cation type : The alkali series probed by molecular dynamics simulations and experiments,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, no. 10, pp. 4255–4264, 2011.
- [123] T. Gamble, K. Decker, T. S. Plett, M. Pevarnik, J.-F. Pietschmann, I. Vlassiouk, A. Aksimentiev, and Z. S. Siwy, “Rectification of ion current in nanopores depends on the type of monovalent cations : Experiments and modeling,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, no. 18, pp. 9809–9819, 2014.

- [124] A. Aksimentiev, “Deciphering ionic current signatures of DNA transport through a nanopore,” *Nanoscale*, vol. 2, pp. 468–483, 2010.
- [125] A. Milchev, “Single-polymer dynamics under constraints : scaling theory and computer experiment,” *Journal of Physics : Condensed Matter*, vol. 23, no. 10, p. 103101, 2011.
- [126] J. A. Cohen, A. Chaudhuri, and R. Golestanian, “Stochastic sensing of polynucleotides using patterned nanopores,” *Phys. Rev. X*, vol. 2, p. 021002, 2012.
- [127] K. Luo, T. Ala-Nissila, and S.-C. Ying, “Polymer translocation through a nanopore : A two-dimensional monte carlo study,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 124, no. 3, p. 034714, 2006.
- [128] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*. Intermolecular and Surface Forces, Elsevier Science, 2010.
- [129] A. Bard and L. Faulkner, *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*. Wiley, 2001.
- [130] M. Firnkes, D. Pedone, J. Knezevic, M. Doblinger, and U. Rant, “Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores : Conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis,” *Nano Letters*, vol. 10, no. 6, pp. 2162–2167, 2010. PMID : 20438117.
- [131] D. Long, J.-L. Viovy, and A. Ajdari, “Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte : Motion and deformation,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 76, pp. 3858–3861, May 1996.
- [132] C. T. A. Wong and M. Muthukumar, “Polymer translocation through α -hemolysin pore with tunable polymer-pore electrostatic interaction,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 133, p. 045101, 2010.
- [133] S. Bezrukov, “Ion channels as molecular coulter counters to probe metabolite transport,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 174, no. 1, pp. 1–13, 2000.
- [134] J. Mathé, A. Aksimentiev, D. R. Nelson, K. Schulten, and A. Meller, “Orientation discrimination of single-stranded DNA inside the alpha-hemolysin membrane channel,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 35, pp. 12377–12382, 2005.
- [135] J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov, and J. J. Kasianowicz, “Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, pp. 8207–8211, 2007.

- [136] S. Matysiak, A. Montesi, M. Pasquali, A. B. Kolomeisky, and C. Clementi, “Dynamics of polymer translocation through nanopores : Theory meets experiment,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 96, p. 118103, 2006.
- [137] A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J.-F. Joanny, and C. Dekker, “Fast DNA translocation through a solid-state nanopore,” *Nano Letters*, vol. 5, no. 7, pp. 1193–1197, 2005.
- [138] D. Fologea, J. Uplinger, B. Thomas, D. S. McNabb, and J. Li, “Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore,” *Nano Letters*, vol. 5, no. 9, pp. 1734–1737, 2005.
- [139] L. H. Thamdrup, N. B. Larsen, and A. Kristensen, “Light-induced local heating for thermophoretic manipulation of DNA in polymer micro- and nanochannels,” *Nano Letters*, vol. 10, no. 3, pp. 826–832, 2010. PMID : 20166745.
- [140] L.-Q. Gu, S. Cheley, and H. Bayley, “Prolonged residence time of a noncovalent molecular adapter, beta-cyclodextrin, within the lumen of mutant alpha-hemolysin pores,” *The Journal of General Physiology*, vol. 118, no. 5, pp. 481–494, 2001.
- [141] K. Luo, T. Ala-Nissila, S.-C. Ying, and A. Bhattacharya, “Dynamics of DNA translocation through an attractive nanopore,” *Phys. Rev. E*, vol. 78, p. 061911, Dec 2008.
- [142] S. Bhattacharya, I. M. Derrington, M. Pavlenok, M. Niederweis, J. H. Gundlach, and A. Aksimentiev, “Molecular dynamics study of MspA arginine mutants predicts slow DNA translocations and ion current blockades indicative of DNA sequence,” *ACS Nano*, vol. 6, pp. 6960–6968, 2012.
- [143] D. B. Wells, V. Abramkina, and A. Aksimentiev, “Exploring transmembrane transport through alpha-hemolysin with grid-steered molecular dynamics,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 127, p. 125101, 2007.
- [144] C. Ke, M. Humeniuk, H. S-Gracz, and P. E. Marszalek, “Direct measurements of base stacking interactions in DNA by single-molecule atomic-force spectroscopy,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 99, p. 018302, Jul 2007.
- [145] C. Lörcher, T. Ala-Nissila, and A. Bhattacharya, “Polymer translocation induced by a bad solvent,” *Phys. Rev. E*, vol. 83, p. 011914, Jan 2011.

- [146] G. Baaken, N. Ankri, A.-K. Schuler, J. R  he, and J. C. Behrends, “Nanopore-based single-molecule mass spectrometry on a lipid membrane microarray,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 10, pp. 8080–8088, 2011.
- [147] C. T. A. Wong and M. Muthukumar, “Polymer capture by electro-osmotic flow of oppositely charged nanopores,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 126, no. 16, p. 164903, 2007.
- [148] B. Luan and A. Aksimentiev, “Control and reversal of the electrophoretic force on DNA in a charged nanopore,” *Journal of Physics : Condensed Matter*, vol. 22, no. 45, p. 454123, 2010.
- [149] M. Mao, J. D. Sherwood, and S. Ghosal, “Electro-osmotic flow through a nanopore,” *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 749, pp. 167–183, 2014.

Résumé

La translocation, le passage d'une macromolécule à travers un pore inséré dans une membrane, est impliquée dans de nombreux processus biologiques. On peut citer comme exemple le transport d'ARN ou de protéines entre les composants de la cellule, et l'infection d'une cellule par le passage d'un ADN viral à travers la membrane cellulaire. Aujourd'hui la translocation est aussi la base d'applications technologiques, comme le fait d'utiliser les pores en tant que détecteurs pour le séquençage rapide de molécules ou en tant que filtre moléculaire. La compréhension du processus de translocation est importante à la fois d'un point de vue fondamental et pour la fabrication de nouveaux dispositifs de translocation à usage spécifique. Dans cette thèse, nous réalisons des expériences et des simulations informatiques pour étudier certains des effets les plus importants mis en jeu lors de la translocation.

Nous réalisons des expériences pour tester l'existence d'un écoulement électro-osmotique (EOF) à travers le nanopore d'alpha-hémolysine de *Staphylococcus aureus*. Malgré de nombreux travaux ces dernières années, la question de l'EOF à travers l'un des nanopores biologiques les plus utilisés fait toujours débat. Nous montrons qu'un EOF existe à travers l'alpha-hémolysine et qu'il contrôle la fréquence d'entrée et le temps de résidence de molécules neutres (beta-cyclodextrines) dans le nanopore. La force de l'EOF dépend du type de cation en solution. En particulier nous montrons que l'EOF est plus fort en présence de LiCl que de KCl.

Nous utilisons des simulations informatiques avec un modèle à "gros grain" pour étudier qualitativement l'influence d'une interaction attractive entre les parois du pore et un polymère en train de transloquer. Nous montrons que la position de l'interaction influence la fréquence d'entrée et le temps de résidence du polymère dans le pore. La fréquence d'entrée est plus grande lorsque l'entrée du pore est attractive. Le comportement du temps de résidence avec la longueur du polymère est qualitativement et quantitativement affecté par la position de l'interaction dans le pore. Cependant, quelle que soit la position de l'interaction, nous observons que le temps de translocation augmente linéairement avec la longueur du polymère lorsque le polymère est plus long que le pore. Cette observation est qualitativement en accord avec des données expérimentales publiées.

Lorsque la translocation est lente, la corrélation entre les mouvements des monomères confinés dans le pore peut jouer un rôle important. Cet effet n'a pas été pris en compte jusqu'à présent. Nous développons un nouveau modèle pour la translocation de polymères, inspiré par le processus d'exclusion asymétrique (*ASEP process*), qui permet d'étudier spécifiquement cet effet. Nous montrons que les mouvements corrélés des monomères confinés dans le pore génèrent un comportement du temps de résidence avec la longueur du polymère qui est qualitativement similaire à ce qui est habituellement interprété comme la présence d'une barrière d'énergie libre dans le processus de translocation, même lorsqu'une telle barrière n'existe pas. Notre modèle réduit fortement le temps de simulation comparé aux simulations de dynamique moléculaire traditionnelles (quelques secondes contre quelques mois pour un système similaire). Cette accélération provient de l'idéalisation des portions du polymère à l'extérieur du pore. Une telle idéalisation est également présente dans les modèles largement utilisés de type Fokker-Planck, mais dans notre cas le comportement de la partie de la chaîne confinée dans le pore est mieux modélisé.

Mots-clefs : translocation, nanopore, macromolécule